

Untersuchungen zur chemo-enzymatischen Synthese von Sialokonjugaten

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Mathias Warwel
aus Aachen

Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. W.-D. Fessner
Mitberichterstatter: Universitätsprofessor Dr. H. J. Lindner
Tag der Einreichung: 08.05.2001
Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2001

Darmstadt 2001

Herrn Prof. Dr. W.-D. Fessner danke ich herzlich für die interessante und abwechslungsreiche Themenstellung, für sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. J. Lindner für seine Tätigkeit als Mitberichterstatter.

Anja danke ich für den Rückhalt und die aufmunternden Worte zur rechten Zeit sowie für ihre langjährige Unterstützung in jeder Hinsicht.

Danken möchte ich meiner Familie für die ständige Unterstützung und besonderes meinem Vater für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Mein Dank gilt weiterhin allen hier nicht genannten Angestellten des Instituts für Organische Chemie der RWTH Aachen, sowie des Instituts für Organische Chemie der TU Darmstadt die ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises für die gute Zusammenarbeit und die gute Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Dipl. Ing. Peter Grundmann, Herrn Dipl. Ing. Ingo Riemann, Frau Dr. Ursula Müllenmeister, Herrn Dipl. Ing. Maik Dröscher, Herrn Dipl. Ing. Achim Porzelle, Herrn Dipl.-Chem. Jürgen Schooren und Herrn Dipl. Ing. Matthias Adler.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
I. Einleitung	1
1. Die biologische Funktion von Kohlenhydraten	1
2. Sialinsäuren	8
2.1. Vorkommen, Bedeutung und Funktion	8
2.2. Synthese von Sialinsäuren	11
3. Synthese von Sialokonjugaten	15
II. Zielsetzung	18
III. Allgemeiner Teil	20
1. Indium-vermittelte, wässrige Allylierung vom Barbier-Typ	20
1.1. Einleitung	20
1.2. Diastereoselektivität der Indium-vermittelten Allylierung	24
1.2.1. Allylierung von D-Mannose mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat	25
1.2.2. Allylierung von D-Arabinose mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat	28
1.3. Synthese von Seitenketten-verkürzten KDN-Derivaten	29
2. Synthese von seitenkettenverkürzten Sialinsäure-Derivaten	33
2.1. Einleitung	33
2.2. α -Aminoaldehyde	33
2.3. C6-Sialinsäurederivate	36
2.4. C7-Sialinsäurederivate	41
3. Ausgewählte Sialinsäurestrukturen	47
3.1. Einleitung	47
3.2. Aldehyd-funktionalisierte Sialinsäuren	47
3.3. Endständig <i>N</i> -funktionalisierte Sialinsäuren	53
3.4. <i>N</i> -Phenylacetylneuraminsäure	57

4.	Enzymatischer Teil	62
4.1.	Einleitung	62
4.2.	Präparation der CMP-Sialat-Synthetase	67
4.2.1.	Aktivitätsbestimmung	67
4.2.2.	Proteingehaltsbestimmung	69
4.2.3.	Enzympräparation	70
4.3.	Substratspektrum der CMP-Sialat-Synthetase	72
4.4.	Enzymatische Synthesen mit der CMP-Sialat-Synthetase	77
4.5.	Enzymatischer Sialyltransfer	80
IV.	Zusammenfassung und Ausblick	84
V.	Experimenteller Teil	88
1.	Produktion, Reinigung und Charakterisierung der Synthetase	88
1.1.	Geräte und Reagenzien	88
1.2.	Assay für die CMP-Sialat-Synthetase	89
1.3.	Proteinbestimmung nach BioRad®	91
1.4.	Fermentation	91
1.5.	Zellaufschluß	92
1.6.	Reinigung der CMP-Sialat-Synthetase	92
2.	Chemische und enzymatische Synthesen	94
2.1.	Geräte und Reagenzien	94
2.2.	Allgemeine Arbeitsvorschriften	96
2.3.	Synthesen	101
VI.	Literaturverzeichnis	183

Anhang - Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs.	absolut (wasserfrei)
Ac	Acetyl
Acryl	Acryloyl
ADP	Adenosin-5`-diphosphat
AllBr	Allylbromid
Alloc	Allyloxycarbonyl
AS	Aminosäure
Asn	L-Asparagin
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
ax	axial
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
Cbz	Carbobenzoxy
CDP	Cytidin-5`-diphosphat
CIAP	Alkalische Phosphatase (alkaline phosphatase from calf intestine)
CMP	Cytidin-5`-monophosphat
CMP-Neu5Ac	Cytidin-5`-monophosphat- <i>N</i> -acetylneuraminsäure
CTP	Cytidin-5`-triphosphat
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett (Spektrenzuordnung)
d	Tag(e)
DC	Dünnschichtchromatographie
DDQ	4,5-Dichlor-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dien-1,2-dicarbonitril
DEAE	Diethylaminoethyl
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
E	Ester
EC	Enzyme Commission
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
eq	äquatorial
Et	Ethyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fuc	L-Fucose
<i>g</i>	Gravitationskonstante
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
Gc	Glycolyl
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
HPLC	High Performance (Pressure) Liquid Chromatography
HV	Hochvakuum
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopranosid
J	Kopplungskonstante
KDN	Ketodesoxynonulosonsäure
KDO	Ketodesoxyoctulosonsäure
L	Lacton
LacNAc	<i>N</i> -Acetylactosamin
LB	Luria-Bertani
LBA	LB mit Ampicillin
M	mol/l
m	Multiplett (Spektrenzuordnung)
<i>m/z</i>	Masse/Ladungszahl (Massenspektroskopie)
Man	D-Mannose
ManNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-mannosamin
ManNH ₂	D-Mannosamin
Me	Methyl

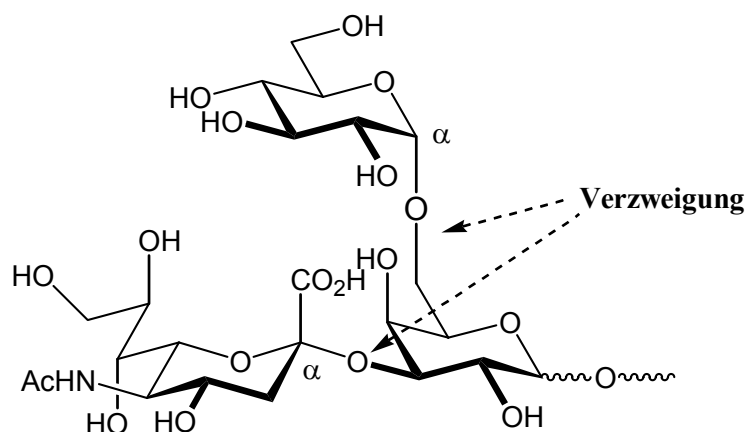
min	Minute
MS	Massenspektrum / -spektroskopie
MW	Molekulargewicht
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NeuA	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Aldolase
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NeuS	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Synthase (-Lyase)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Nu	Nucleophil
OD	optische Dichte
PEP	Phosphoenolpyruvat
PhAc	Phenylacetyl
PK	Pyruvatkinase
PP _i	anorganisches Pyrophosphat
ppm	parts per million
Prop	Propyl
PSA	Polysialinsäure
Py	Pyridin
Pyr	Pyruvat
R _f	Rückhaltefaktor (Dünnschichtchromatographie)
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (Spektrenzuordnung)
S	Säure
SiaT	Sialyltransferase
SLe ^x	Sialyl-Lewis ^x
spez. Akt.	spezifische Aktivität
TBA	Thiobarbitursäure
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
<i>tert</i>	<i>tertiär</i>
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	L-Threonin
TMGA	Tetramethylguanidiniumazid

TMSOTf	Trimethylsilyltriflat
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit (1 Unit = 1 μ mol Umsatz/min)
v/v	volume per volume
Vol	Volumeneinheit
w/v	weight per volume

I. Einleitung

1. Die biologische Funktion von Kohlenhydraten

Die Grundlage aller lebender Organismen wird durch drei große Gruppen von Biopolymeren gebildet: Proteine, Nucleinsäuren und Kohlenhydrate.¹ Proteine und Nucleinsäuren sind durch die Ausbildung linearer, kovalenter Verknüpfungen von bis zu zwanzig unterschiedlichen Monomereinheiten gekennzeichnet, wodurch eine enorme Anzahl an verschiedenen Sequenz-Strukturen aufgebaut wird. Proteine setzen sich normalerweise aus zwanzig verschiedenen α -Aminosäuren (proteinogenen AS) zusammen, wobei der Zusammenschluß durch die Ausbildung von Säureamid- oder Peptid-Bindungen geschieht. Die Gruppe der Nucleinsäuren läßt sich nach der eingebauten Zucker-Komponente in Ribonucleinsäuren (RNA) und Desoxyribonucleinsäuren (DNA) unterteilen. Charakteristisch für alle Nucleinsäuren sind 3'-5'-Phosphodiester-Brücken, die die einzelnen Monomereinheiten miteinander verbinden. Die immense Anzahl möglicher unterschiedlicher Strukturen der Proteine und Nucleinsäuren erreicht jedoch bei weitem nicht die strukturelle Vielfalt, die bei den Glycopolymeren erzielt wird.²⁻⁴ Obwohl bei der Biosynthese von Glycopolymeren in der Regel nur wenige Varianten an Monosaccharidbausteinen Verwendung finden, ist wegen der Multifunktionalität der



einzelnen Monomereinheiten der Aufbau einer nahezu unbegrenzten Anzahl komplexer Strukturen möglich. So können aus den bei Säugern in der Regel verwendeten (sieben oder) acht Monosacchariden (**Abb. 1**) in Abhängigkeit von der Sequenz, der Art der Verzweigung, der Konfiguration des glycosid-

ischen C-Atoms und möglichen Modifikationen der Hydroxy- oder Aminogruppen beispielsweise bereits mehrere Millionen topologisch unterschiedliche Tetrasaccharide entstehen.

Bei Proteinen und Nucleinsäuren als direkten Genprodukten ist die Abfolge der Monomereinheiten durch ein Templat fest vorgegeben. Die Biogenese von Glycopolymeren ist hingegen von vielen Faktoren abhängig und läßt daher eine Reihe von Variationen zu. So ist die Art und der Grad der Glycosylierung entscheidend abhängig vom Zell- bzw. Gewebetyp, dem Entwicklungsstadium der Zelle, der Konzentration und Art beteiligter Enzyme und Cofaktoren sowie einer Reihe weiterer äußerer Bedingungen zum Zeitpunkt der Synthese. Aufgrund dieser Abhängigkeiten führt die Biosynthese von Glycopolymeren in den seltensten Fällen zu einer einzigen definierten Struktur, vielmehr liegen typischerweise verschiedene Glycoformen nebeneinander vor.¹

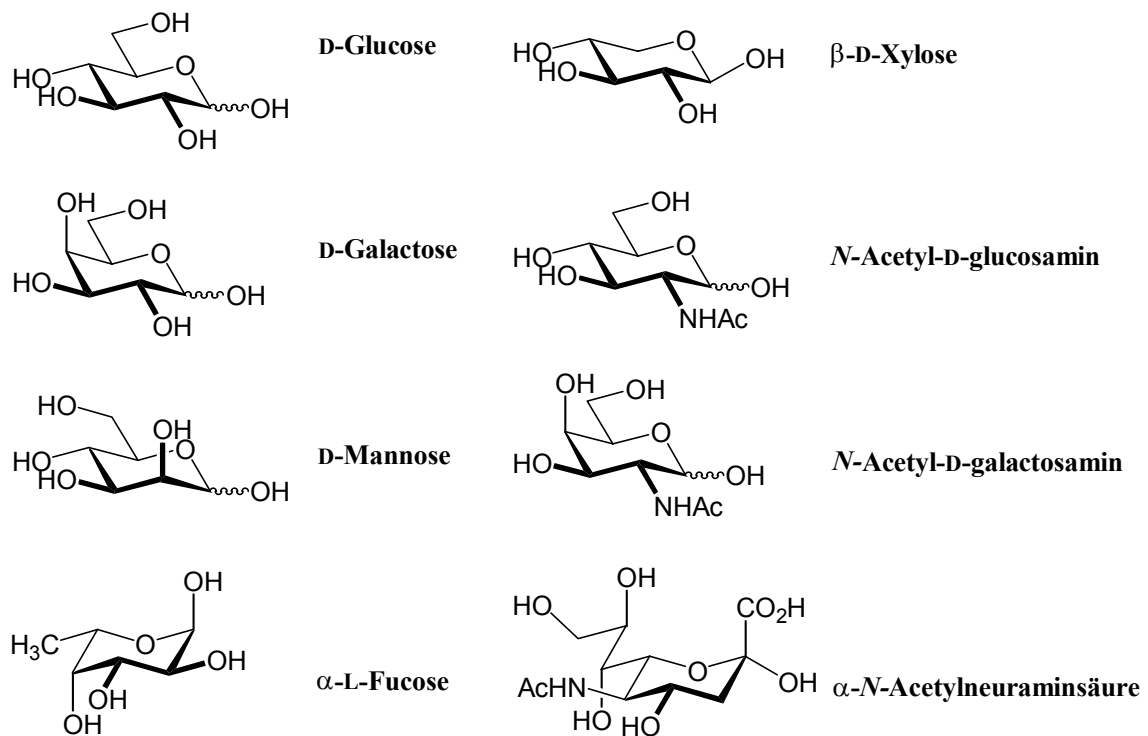


Abb. 1: Bei Säugern häufig auftretende Monosaccharideinheiten

Die nahezu unbegrenzte Anzahl topologisch unterschiedlicher Oligosaccharide ermöglicht es, effizient riesige Datenmengen zu kodieren, die für biologische Erkennungsprozesse – von interzellulärer Kommunikation über Zelladhäsion, Infektion, Zelldifferenzierung und Signalübertragung bis hin zu Zellentwicklung und Metastase – benötigt werden. Die Isolierung und Charakterisierung dieser Verbindungen gestaltet sich häufig äußerst schwierig, was zum einen auf die natürliche Mikroheterogenität solcher Glycopolymere, zum anderen auf die meist geringe Konzentration *in vivo* zurückzuführen ist. Neben der geringen Bioverfügbarkeit

von Oligosacchariden gestalten sich auch chemische, enzymatische bzw. chemoenzymatische Synthesen oftmals mühsam. Diese elementare Problematik der Gewinnung von ausreichenden Substanzmengen für biologische Untersuchungen hat zur Folge, daß trotz der zentralen Bedeutung von Oligosacchariden die Entwicklung von pharmazeutischen Anwendungen dieser Substanzklasse verglichen mit der anderer Biomoleküle sehr langsam verläuft.

Kohlenhydrate spielen in der Natur eine vielfältige Rolle. Sie werden in riesigen Mengen durch Photosynthese produziert und fungieren auch als tragendes Gerüstmaterial in den Zellwänden von Pflanzen und Bakterien, als Speicher- und Reservestoff in lebenden Organismen sowie als biosynthetische Ausgangskomponenten. Neben diesen seit langem bekannten Funktionen spielen Kohlenhydrate eine herausragende Rolle bei vielen physiologisch und pathologisch relevanten Erkennungsphänomenen.⁵⁻⁸ Die Kohlenhydratstrukturen sind in Form von Glycokonjugaten auf der Säugerzelloberfläche fixiert. Vorwiegend handelt es sich dabei um Glycoproteine und Glycolipide, also an Peptide bzw. Lipide gebundene Zuckereinheiten.^{9,10} Diese charakteristischen Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche von Zellen zeigen sich verantwortlich für die interzelluläre Kommunikation. Viele Krankheiten wie Krebs, rheumatoide Arthritis, Herzinfarkt oder Schlaganfall finden ihre Ursache in einer Störung dieser interzellulären Kommunikation.^{1,11}

Bakterielle oder pflanzliche Glycolipide sind z.B. die zu den Glycoglycerolipiden gehörenden Glycosyldiacylglycerine, d.h. Glycerin-Derivate, die einen Zucker- und zwei Fettsäurereste enthalten, während die vorwiegend im Nervengewebe von Säugern auftretenden Glycolipide von Ceramiden abgeleitet und daher präziser durch die Bezeichnung Glycosphingolipide oder Glycosphingoside charakterisiert sind.¹² Der Ceramid-Rest setzt sich hierbei aus dem Aminoalkohol Sphingosin und einer Fettsäure zusammen (**Abb. 2**).

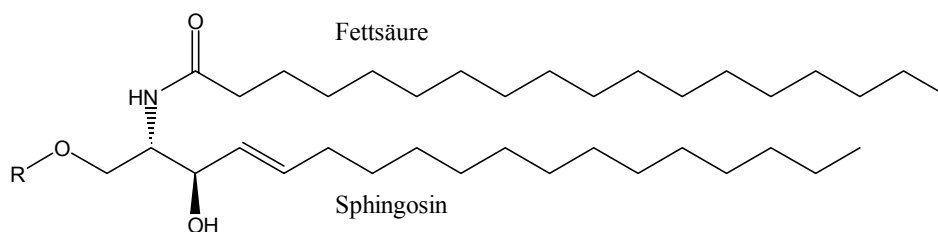


Abb. 2: Struktur der Glycosphingolipide (R = variabler Zuckeranteil)

In Abhängigkeit vom hydrophilen Zuckeranteil unterscheidet man wiederum die Cerebroside, die nur eine Monosaccharid-Einheit tragen (meist D-Glucose oder D-Galactose), die Sulfatide mit ihren sulfatveresterten Monosacchariden und die Ganglioside, die mit (oft verzweigten) Oligosaccharid-Ketten behaftet sind.

Besonders die Gruppe der Ganglioside ist in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, nachdem einzelne Ganglioside als Rezeptoren für Cholera- und Tetanus-Toxine identifiziert wurden.¹³ Das strukturell einfachste, sialinsäurehaltige Gangliosid G_{M3} verdeutlicht beispielhaft die enorme Bedeutung dieser Substanzklasse, da es auf menschlichen Tumorzellen ein abnormal niedriges Vorkommen (bei gleichzeitiger Zunahme der G_{D3} -Konzentration) zeigt, den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) moduliert und eine immunsuppressive Wirkung besitzt. Als Bausteine von Zell-Membranen sind Ganglioside wie G_{M3} im zentralen Nervensystem an der transmembranen Signaltransduktion beteiligt, sie dienen über den Sialinsäurerest als Bindungsstelle für Viren, Bakterien und Effektoren und nehmen entscheidenden Einfluß auf die Zelldifferenzierung verschiedenartiger Zelltypen (**Abb. 3**).¹⁴⁻²³

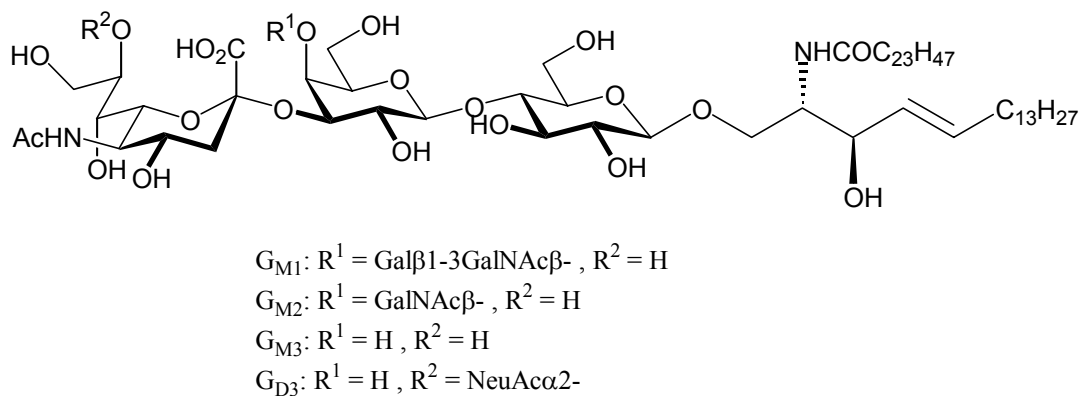


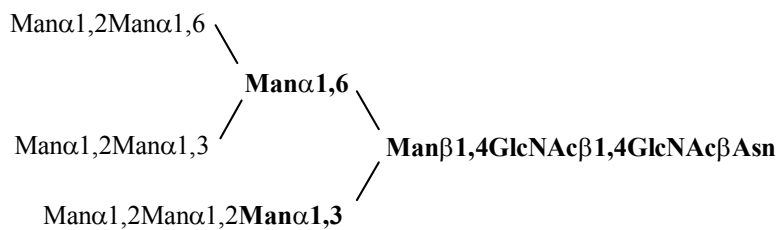
Abb. 3: Beispiel typischer Gangliosid-Strukturen

Glycosidisch gebundene, strukturell variantenreiche bioaktive Oligosaccharid-Seitenketten werden ähnlich wie bei den Lipiden auch bei vielen Proteinen gefunden. Die hauptsächlich im Tier- und Pflanzenreich, seltener in Bakterien und Virushüllen auftretenden Strukturen werden nach der Art der Verknüpfung in *N*- und *O*-verküpfte Glycoproteine differenziert.^{1, 3}

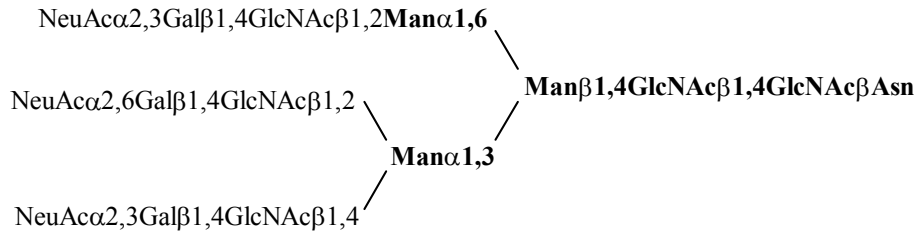
Die *N*-verküpfte Oligosaccharide besitzen alle eine gemeinsame Kernstruktur (Core) bestehend aus zwei GlcNAc- und drei Man-Einheiten. Die Verknüpfung erfolgt hierbei durch

eine β -glycosidische Bindung zwischen einem GlcNAc-Rest und dem Stickstoffatom der Amidseitenkette eines Asparaginrestes. Nach der Art der Zucker und der Verzweigungen werden die *N*-verknüpften Glycoproteine in weitere Klassen, den mannosereichen, den komplexen und den hybriden Typ unterteilt (**Abb. 4**).

mannosereicher Typ:



komplexer Typ:



hybrider Typ:

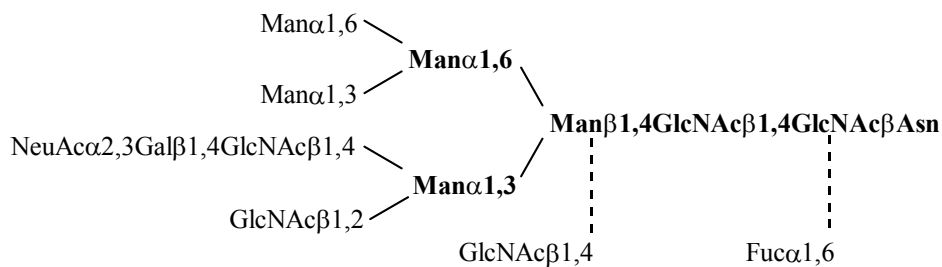


Abb. 4: Strukturklassen *N*-verknüpfter Glycoproteine

Die weniger weit verbreiteten und weniger gut untersuchten *O*-verknüpften Glycoproteine besitzen im Gegensatz zu den *N*-verknüpften keine gemeinsame Kernstruktur. Lediglich die α -glycosidische Bindung zwischen einer GalNAc-Einheit und der Hydroxygruppe eines Serin- oder Threoninrestes ist ein charakteristisches Merkmal für diese Verbindungsklasse. Eine weitere Klassifizierung der *O*-verknüpften Glycoproteine erfolgt über die unterschiedlichen Zuckerstrukturen, die direkt an die primäre GalNAc-Einheit gebunden sind (**Abb. 5**).

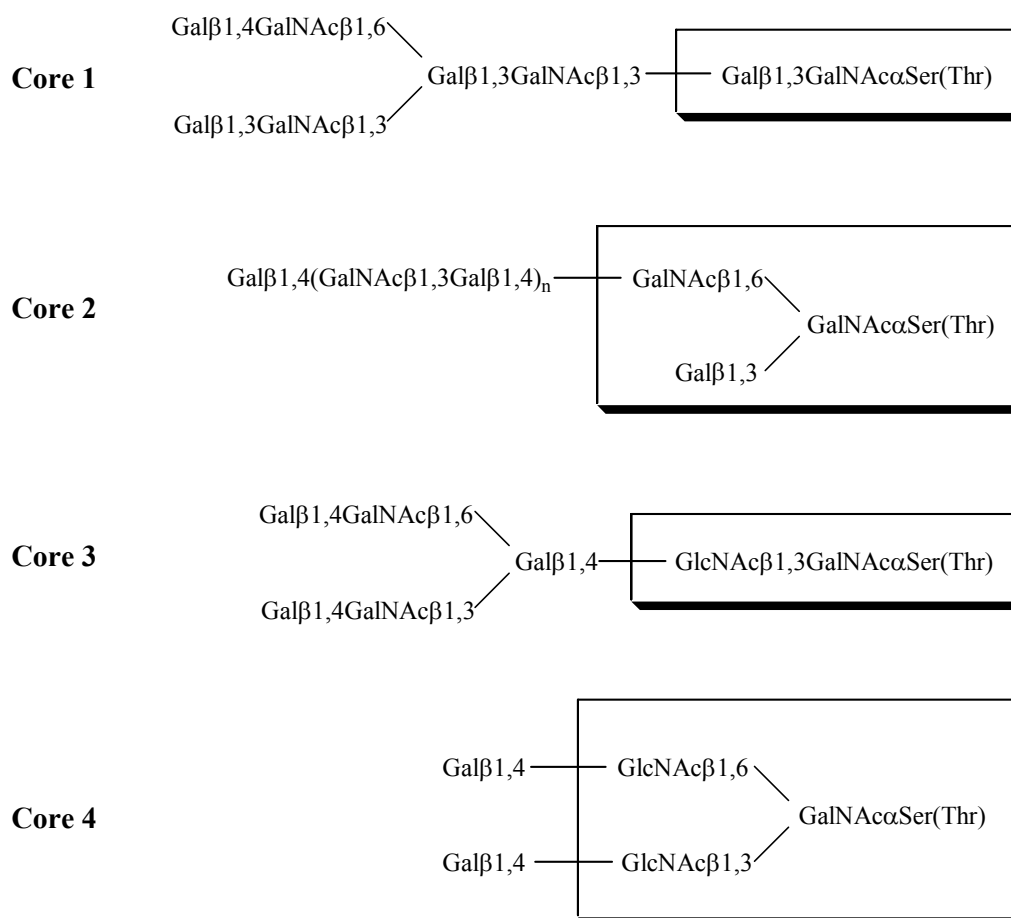


Abb. 5: Strukturklassen *O*-verknüpfter Glycoproteine

Die als Glycoproteine gebundenen Kohlenhydratstrukturen nehmen als Hauptkomponenten der Zelloberfläche einen entscheidenden Einfluß auf Wachstum, Entwicklung, Zelladhäsion, Immunabwehr, Infektion, Metastase und Signalübertragung. Die biologische Wirkungsweise der Zuckerstrukturen ist hierbei bei weitem noch nicht vollständig geklärt und verstanden, jedoch ist bekannt, daß die Glycosylierung von Proteinen einen elementaren Einfluß auf die

Proteinfaltung und Konformationsstabilität ausübt, daß die elektrische Ladung und damit die Wasserbindungskapazität erhöht wird und daß die Glycosylierung einem gewissen Schutz vor Proteasen und Antikörpern bewirkt.²

Eine Störung der durch Kohlenhydratstrukturen vermittelten, interzellulären Kommunikation kann die Ursache einer Reihe akuter und chronischer Krankheiten sein. So ist es mittlerweile erwiesen, daß Erkrankungen wie Schlaganfall, Thrombosen, kardiologischer Schock, Rheuma, Psoriasis, Dermatitis, Atemnotsyndrom des Erwachsenen, bakterielle Meningitis, Encephalitis, Heuschnupfen und Asthma auf eben solch einer gestörten interzellulären Kommunikation basieren. Auslöser derartiger Krankheiten sind in der Störung der Leukozyt-Endothel-Erkennung zu suchen.²⁴

Als zelluläre Bestandteile des Blutes spielen Leukozyten eine entscheidende Rolle bei der Immunüberwachung. Der komplexe und mehrstufige Vorgang der Leukozytenauswanderung findet sowohl während eines chronischen Entzündungsprozesses als auch bei einer akuten Entzündung statt, wobei eine spezifische und genau kontrollierte gegenseitige Erkennung von Leukozyten und Endothelzellen Voraussetzung ist.²⁴⁻²⁶ Diese Erkennung wird durch die Wechselwirkung membranständiger Adhäsionsrezeptoren (z.B. L-, E-, P-Selektine und Integrine) mit ihren ebenfalls membranständigen Liganden gewährleistet. Entzündungsmediatoren verursachen eine Exprimierung der Adhäsionsrezeptoren an der Oberfläche der Endothelzellen, welche verstärkt in Wechselwirkung mit den membranständigen Kohlenhydratliganden der Leukozyten treten. Die niedrig-affine Bindung der Leukozyten an die Endothelzellen verursacht eine Verlangsamung der Leukozytengeschwindigkeit (Rolling). Die Reduzierung der Leukozytengeschwindigkeit ermöglicht nun die Ausbildung hoch-affiner Bindungen zwischen Leukozyten und Endothel, was wiederum eine stabile Adhäsion der Leukozyten an das Endothel und schließlich die Extravasation aus dem Blutgefäß zur Folge hat.

Die sialinsäurehaltige Tetrasaccharid-Einheit Sialyl-Lewis^x (SLe^x) spielt für die Leukozytenadhäsion eine wesentliche Rolle (**Abb. 6**). Als Teilstruktur von Glycosphingolipiden und Glycoproteinen, die unter anderem auf der Leukozytenmembran lokalisiert sind, dient SLe^x für die kohlenhydratbindenden Selektine als Ligand. Der Verlauf der oben aufgeführten Krankheiten wird durch eine übermäßige Ansammlung von Leukozyten im Bereich der Infektion bzw. des pathologischen Prozesses negativ beeinflusst. Daher herrscht derzeit ein großes Interesse an der Entwicklung von Adhäsionsblockern,

wobei speziell die Synthese komplexer Kohlenhydrate vom Typ des Sialyl-Lewis^x einen vielversprechenden Ansatzpunkt darstellt.

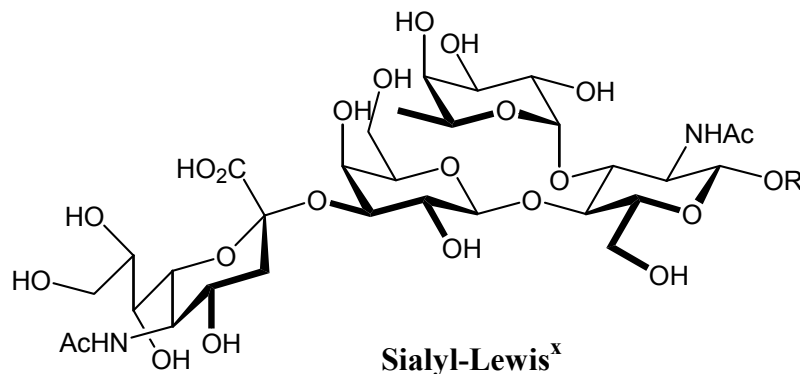


Abb. 6: Struktur des Sialyl-Lewis^x (SLe^x)-Tetrasaccharids

2. Sialinsäuren

2.1. Vorkommen, Bedeutung und Funktion

Die zur Klasse der 3-Desoxy-2-ulosonsäuren gehörenden Sialinsäuren stellen eine besonders wichtige Gruppe von Signalzuckern dar, welche in Glycokonjugaten stets in exponierter Stellung zu finden sind.^{27,28} Die Sialinsäuren kommen meist α -glycosidisch gebunden in Bakterien, tierischen Zellen und Körperflüssigkeiten, jedoch nicht im Pflanzenreich vor. Der bekannteste und häufigste Vertreter dieser Substanzklasse ist die *N*-Acetylneuraminsäure (*N*-Acetyl-5-amino-3,5-didesoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranulosonsäure) die aus einer Reihe natürlicher Quellen isoliert werden konnte. So macht sie 2-11% des Trockengewichts von eßbaren, chinesischen Vogelnestern aus²⁹⁻³¹ und ist mit bis zu 25% in Unterkieferspeicheldrüsen enthalten.^{32,33} Strukturell umfaßt die Familie der Sialinsäuren bislang 36 natürlich vorkommende Derivate der *N*-Acetylneuraminsäure, die alle in *N*-acylierter Form vorliegen, wobei als Grundgerüst entweder die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) oder die *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) fungiert (**Abb.7**).

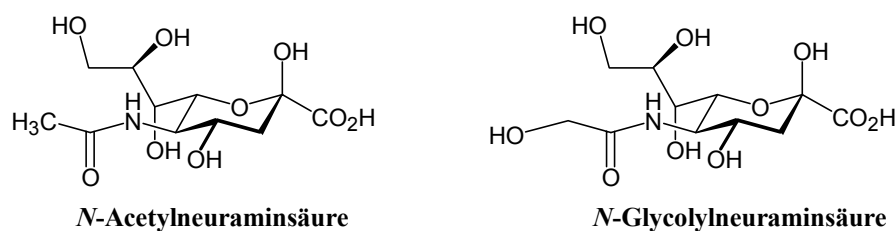


Abb. 7: 2C_5 -Konformation von Neu5Ac und Neu5Gc

Typische Modifikationen sind hauptsächlich an den Hydroxylfunktionen von C-4, -7, -8 oder -9 zu finden, wobei eine oder mehrere Alkoholfunktionen in *O*-acetylierter Form vorliegen können. Desweiteren sind entsprechende Derivate bekannt, in denen zwischen C-2 und C-3 eine Doppelbindung angeordnet ist (2-Desoxy-2,3-dehydro-neuraminsäure, Neu5Ac2en), oder auch die Aminogruppe an C-5 gegen eine Hydroxylgruppe substituiert sein kann (Ketodesoxynonulosonsäure, KDN) (**Abb. 8**).

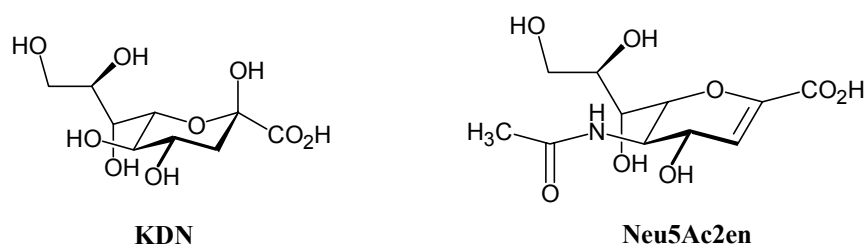


Abb. 8: Ketodesoxynonulosonsäure und 2-Desoxy-2,3-dehydro-neuraminsäure

Sialinsäuren sind als endständige Komponenten von Oligosacchariden, Glycoproteinen und Glycolipiden anzutreffen, wobei die Anbindung hauptsächlich α -ketosidisch erfolgt.^{34,35} Typisch sind hierbei α -2,3-Verknüpfungen zu Galactose, α -2,6-Verknüpfungen zu Galactose bzw. *N*-Acetylgalactosamin oder auch α -2,8- oder α -2,9-verkürfte Polysialinsäuren. Die Cytidin-5'-monophosphat-aktivierte *N*-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac), die bei der enzymatischen Sialylierung von Oligosacchariden eine elementare Rolle spielt, ist das einzig bekannte Sialinsäure-Konjugat, in dem die Verknüpfung nicht α - sondern β -glycosidisch erfolgt. Derivate wie die 2-Desoxy-2,3-dehydro-neuraminsäure, denen die Hydroxylgruppe am anomeren C-2-Atom zur Ausbildung glycosidischer Bindungen fehlt, liegen dagegen als freie Zucker vor und sind vorwiegend in Körperflüssigkeiten zu finden. Die freien

Sialinsäuren liegen in wässriger Lösung als α/β -Anomerengemisch vor, in dem das Gleichgewicht jedoch deutlich die β -Anomeren (92-95%) bevorzugt.^{36,37}

Die durch Sialinsäuren beeinflussten biologischen Funktionen sind äußerst vielschichtig und beruhen in erster Linie auf ihrer negativen Ladung sowie ihrer exponierten terminalen Stellung, die sie in vielen Glycoproteinen, Gangliosiden und auf den Zelloberflächen von Bakterien, Viren und Tumorzellen einnehmen. Obwohl es noch nicht gelungen ist, alle durch Sialinsäuren verursachten Phänomene exakt zu entschlüsseln, so kann doch eine Kategorisierung der biologischen Funktionen erfolgen.³⁴

Die erste Funktion beruht auf der negativen Gesamtladung sialylierter Glycokonjugate. Bis zu 10^7 Sialinsäure-Einheiten sind an eine einzige menschliche Zelle gebunden und auf der Zelloberfläche lokalisiert. Die daraus resultierende negative Ladung der Zelloberfläche verhindert zum einen eine direkte Aggregation der Zellen untereinander durch elektrostatische Abstoßung, zum anderen wird aber dadurch eine steuerbare Zusammenlagerung über Calcium-Brücken ermöglicht. Ein weiterer Effekt der negativen Ladung ist die Beeinflussung der Stabilität und der Starrheit der Zelloberflächen, sowie die Unterstützung des Ionentransports durch die Zellmembran.

Eine zweite, wichtige Funktion von Sialinsäuren ist ihr Einfluß auf die Viskosität vieler Körperflüssigkeiten, Sekrete und Mucine, welche stark vom Sialylierungsgrad gelöster Proteine abhängt.³⁸ Bei den in schleimigen Sekreten der meisten Epithelien enthaltenen Mucinen handelt es sich um Sialinsäure-reiche Glycoproteine, die wichtige Transport- aber auch Schmier- und Schutzfunktionen wie das Abpuffern überschüssiger Magensäure oder die Gelenkschmierung ausüben.

Die Rolle von Sialinsäuren als biologische Rezeptoren kann in eine weitere Kategorie eingegliedert werden. Durch ihre exponierte Stellung als terminale Einheit von komplexen Oligosaccharidstrukturen spielen Sialinsäuren bei vielen Infektionskrankheiten eine elementare Rolle. Es konnte gezeigt werden, daß die Sialinsäureeinheiten als Bindungsstelle für viele Bakterien, Viren, Toxine, Enzyme oder auch Hormone fungieren.^{39,40} Ein Beispiel hierfür ist die spezifische Anheftung des Influenza A-Virus über seine Hemagglutinin-Einheit an spezielle, sialylierte Membran- oder Oberflächenproteine. Eine Anheftung des Influenza A-Virus erfolgt hierbei erst dann, wenn eine am Virus enthaltene Sialidase (ein Enzym, das die glycosidische Bindung von Sialinsäuren spezifisch erkennt und hydrolysiert) die terminalen Sialinsäureeinheiten vom Oligosaccharid abgespalten hat. Eine einfache

Modifikation der Sialinsäurereste – die Einführung einer *O*-Acetylgruppe an der C9-Position – kann diesen Abbau verhindern und somit einer Anheftung des Virus vorbeugen.⁴¹

Die letzte und vielleicht wichtigste Kategorie der biologischen Funktionen von Sialinsäuren ist die Fähigkeit zur Maskierung der Strukturen, an die sie gebunden sind.⁴² Durch glycosidische Anbindung von Sialinsäuren an terminale Zuckerreste von Glycokonjugaten können sehr wirkungsvoll wichtige Antigen-Strukturen und Erkennungsmarker auf Zelloberflächen blockiert und somit die entsprechenden Zellen vor dem Zugriff des sie umgebenden Immunsystems geschützt werden. Es ist ein bekanntes Phänomen, daß Zellen in einem frühen Entwicklungsstadium sehr viel stärker sialyliert sind als ältere Zellen.⁴³ Diese Beobachtung konnte durch entsprechende Experimente weiter untermauert werden. Werden Zellen mit einem hohen Sialylierungsgrad wie Erythrozyten, Lymphozyten oder Thrombozyten dem Körper entnommen, mit Sialidase behandelt und wieder in den Körper injiziert, so erfolgt innerhalb weniger Stunden ein vollständiger Abbau dieser desialylierten Zellen, während der vollständige Abbau von nicht mit Sialidase behandelten Zellen erst nach einen Zeitraum von bis zu 120 Tagen eintritt.⁴⁴ Der Sialylierungsgrad von Zelloberflächen spielt somit eine herausragende Rolle bei der Regulation der Lebensspanne von Zellen, weiterhin nimmt er aber auch bei vielen anderen biologischen und pathologischen Prozessen wie dem programmierten Zelltod oder der Metastasierung von Krebs eine wichtige Stellung ein.

2.2. Synthese von Sialinsäuren

Die Synthese von Sialinsäuren kann sowohl enzymatisch als auch chemisch erfolgen. Für die enzymatische Herstellung stehen prinzipiell drei unterschiedliche Biosynthesewege zum Aufbau von Sialinsäurestrukturen unter Verwendung von Lyasen zur Verfügung.

Diese Gruppe von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen aufbauenden bzw. spaltenden Enzymen läßt sich formal in Abhängigkeit der jeweiligen nucleophilen Komponenten in mehrere Klassen unterteilen, wobei speziell für die Sialinsäuresynthese die Pyruvat-abhängigen Lyasen (Aldolasen) und die Phosphoenolpyruvat(PEP)-abhängigen Lyasen („Synthasen“) am bedeutsamsten sind. Ihnen gemeinsam ist die Übertragung des C-3-Fragments auf eine Aldose unter Ausbildung von 3-Desoxy-2-oxocarbonsäuren (**Abb. 9**).⁴⁵

anorganisches Phosphat freigesetzt wird (**Abb. 11**).⁴⁵ Die NeuAc-Lyase, die im Sialinsäurestoffwechsel der humanpathogenen Bakterien *Neisseria meningitidis* Serogruppe B und *E. coli* K1 vorkommt, ist bislang nicht kommerziell erhältlich, das Enzym aus *Neisseria meningitidis* Serogruppe B konnte aber in unserem Arbeitskreis von Frau Dr. Knorst mit Hilfe eines effektiven Überexpressionssystems in *E. coli* in großem Maßstab produziert und für präparative Umsetzungen ausreichend aufgereinigt werden.⁵²

Diese NeuAc-Lyase zeichnet sich hierbei durch eine breite Substrattoleranz aus, so können die Positionen C2, C4, C5 und C6 von dem natürlichen Substrat ManNAc abweichend substituiert sein; lediglich die *manno*-Konfiguration an C3 ist essentiell.⁵²

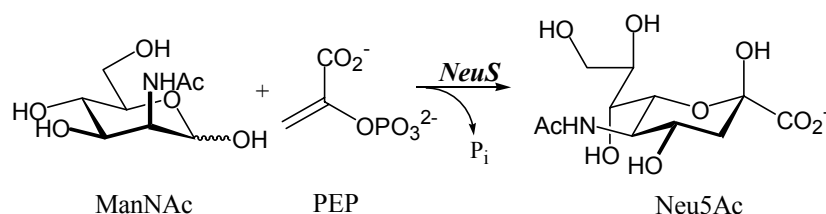


Abb. 11: NeuS-katalysierte Neu5Ac-Synthese

Eine dritte enzymatische Möglichkeit zum Aufbau von Sialinsäurestrukturen kann von der Neu5Ac-Biosynthese in Säugetierzellen abgeleitet werden. Mit Hilfe einer Kinase und unter Verwendung von ATP wird *N*-Acetylmannosamin in 6-Position phosphoryliert und das Zuckerphosphat anschließend von einer spezifischen Synthase mit PEP unter Freisetzung von anorganischem Phosphat zum 9-Phosphat der *N*-Acetylneuraminsäure kondensiert. Die freie Neuraminsäure kann abschließend durch Dephosphorylierung mit einer spezifischen Phosphatase erhalten werden (**Abb 12**).

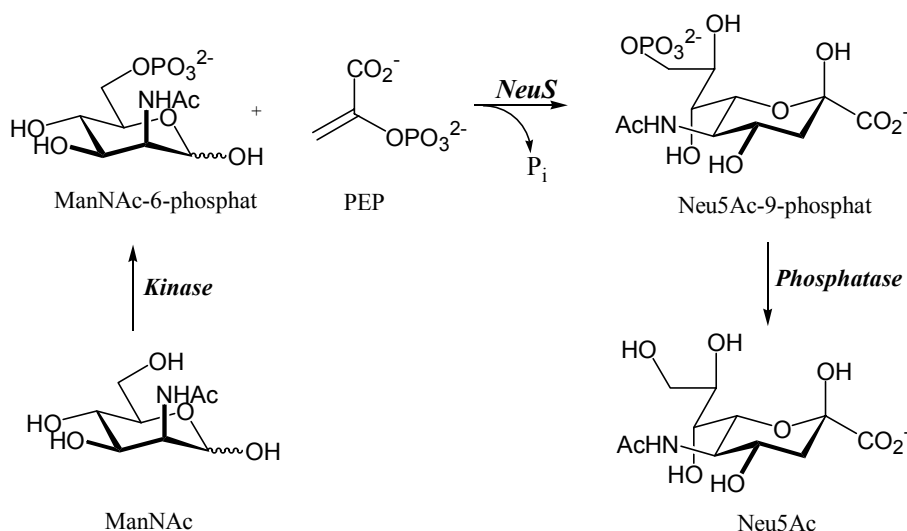


Abb. 12: Neu5Ac-Biosynthese in Säugerzellen

Neben den erwähnten enzymatischen Methoden zum Aufbau von Sialinsäurestrukturen bietet sich als chemisches Äquivalent eine Indium-vermittelte Synthese an, die auch den gezielten Aufbau solcher nicht-natürlicher Strukturen erlaubt, die mittels enzymatischer Verfahren nicht zugänglich sind.

Die Metall-vermittelte (Zn, Sn, Cd, Pb, Bi, In) Allylierung von Carbonylverbindungen unter Ausbildung von Homoallylalkoholen konnte 1977 von *Wolinsky* erstmalig auch im protischen Milieu (95% Ethanol) erzielt werden (**Abb 13**).⁵³

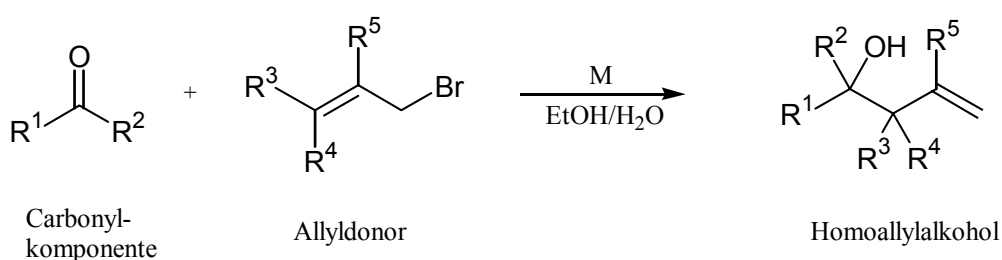


Abb. 13: Barbier-Typ-Allylierung unter Ausbildung von Homoallylalkoholen

Basierend auf diesen Erkenntnissen folgte eine Reihe von Arbeiten, die die überragenden Eigenschaften, speziell der Indium-vermittelten Barbier-Typ-Reaktion, aufzeigten.⁵⁴⁻⁶² Indium-vermittelte Allylierungsreaktionen zeichnen sich im Vergleich zu den analogen Zink- oder Zinn-vermittelten Umsetzungen durch deutlich erhöhte Reaktionsgeschwindigkeiten und

bessere Ausbeuten aus. Aus diesem Grunde benötigt die Indium-vermittelte Allylierung keine zusätzliche Unterstützung wie Ultraschall-, Säure- oder Wärmeaktivierung, die bei den weniger reaktiven Metallen oftmals unerlässlich ist. Da unter den milden Bedingungen der wässrigen Indium-vermittelten Barbier-Reaktion weder Ester- noch Carbonsäure-Funktionen angegriffen werden,⁶³⁻⁶⁷ können sowohl ester- als auch carbonsäurehaltige Allylverbindungen wie etwa Brommethacrylester oder Brommethacrylsäure als Allyldonoren dienen, welche als Pyruvat-Äquivalent nach Ozonolyse den Zugang zu Sialinsäure-Analoga aus den entsprechenden Aldosen eröffnen.^{64,68-71}

Als erste Sialinsäure konnte 3-Desoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-2-nonulopyranulosonsäure (KDN) von *Chan* und *Li* 1992 auf diesem Wege mit knapp 50% Gesamtausbeute aus D-Mannose synthetisiert werden (**Abb 14**).⁷⁰

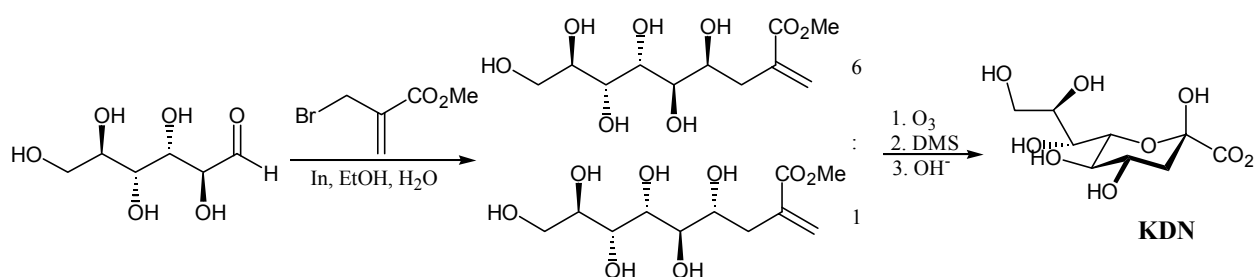


Abb. 14: Indium-vermittelte KDN-Synthese⁷⁰

3. Synthese von Sialokonjugaten

Bei der chemischen Synthese von Oligosacchariden stellt die Knüpfung der glycosidischen Bindungen wegen der großen Vielfalt an Verknüpfungsmöglichkeiten zwischen den multifunktionellen Monosacchariden und der geringen Reaktivitätsunterschiede der Hydroxygruppen die größte Herausforderung dar.^{34,35} Die Einführung von Sialinsäure-gruppierungen erweist sich hierbei als besonders schwierig, was auf die strukturellen Besonderheiten dieser Stoffklasse zurückzuführen ist (**Abb. 15**).

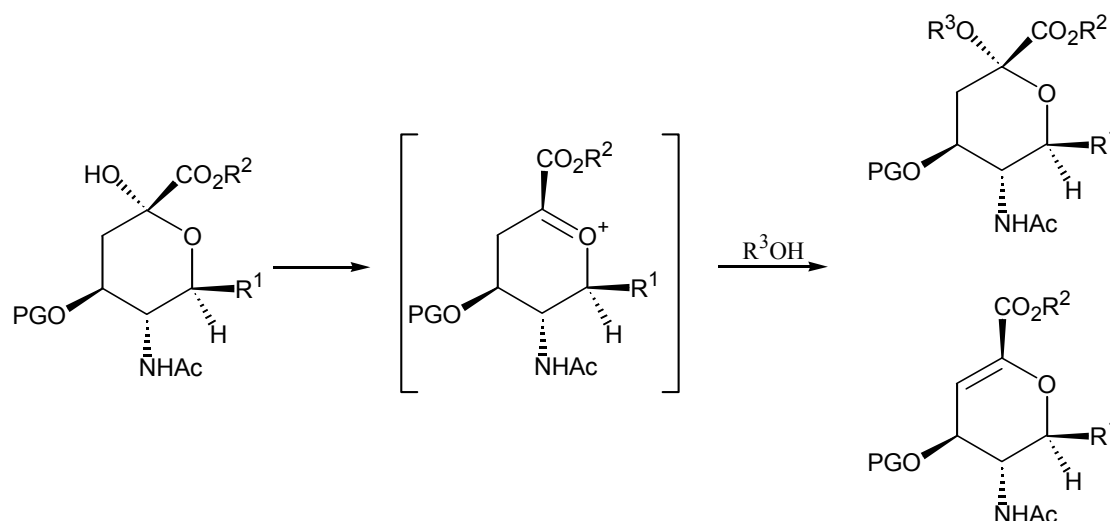


Abb. 15: Glycosylierungsproblematik bei Sialinsäuren

Neben einer durch die Carboxy-Gruppe verursachten sterischen Hinderung bei der Ausbildung glycosidischer Bindungen erschwert die Carboxy-Funktion am anomeren Zentrum wegen elektronisch destabilisierender Effekte die Bildung eines Oxonium-Ions und begünstigt gleichzeitig die intramolekulare Eliminierung zum 2,3-Dehydro-Derivat. Zusätzlich wird durch das Fehlen eines Substituenten an C-3 mit dirigierendem Nachbargruppeneffekt die Stereoselektivität reduziert.

Einen Ausweg aus dieser Glycosylierungsproblematik bieten enzymatische Methoden an. Der Einsatz von Glycosidasen,⁷² die zwar entgegen ihrer *in vivo* katabolen Funktion prinzipiell unter thermodynamischer oder kinetischer Kontrolle auch in synthetischer Richtung eingesetzt werden können, offeriert bei schlechten Ausbeuten und den damit verbundenen Schwierigkeiten der Produktisolierung eine wenig attraktive Alternative. In Anlehnung an den Biosyntheseweg bieten dagegen hochselektive Sialyltransferasen eine Lösung des synthetischen Glycosylierungsproblem an. In einem zweistufigen Prozeß wird *in vivo* zuerst die Sialinsäure mit Hilfe einer CMP-Sialat-Synthetase (EC 2.7.7.43) unter Verbrauch von CTP zur CMP-*N*-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) aktiviert; anschließend wird die aktivierte Sialinsäure durch eine Sialyltransferase unter Bildung des entsprechenden sialylierten Glycokonjugats übertragen (**Abb. 16**).

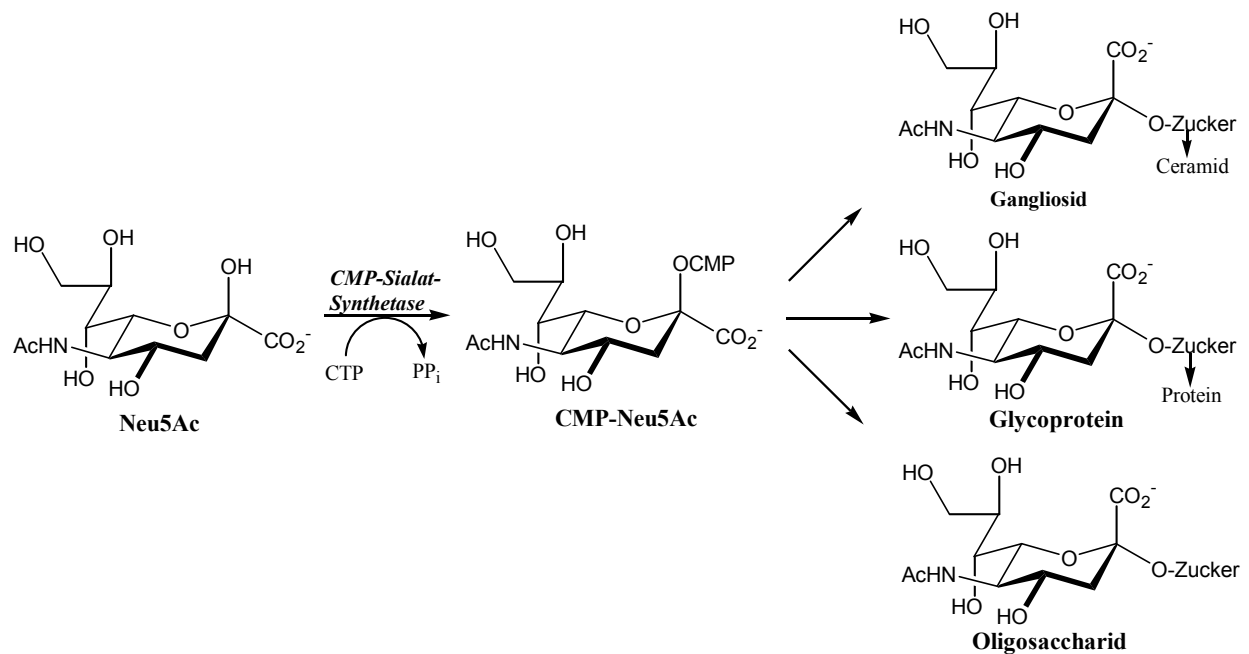


Abb. 16: Biosynthese von Sialokonjugaten

Die für die enzymatische Aktivierung benötigten CMP-Sialat-Synthetasen sind jedoch in der Regel schlecht verfügbar, besitzen geringe spezifische Aktivitäten und erlauben nur geringe Modifikation an den umzusetzenden Sialinsäuren. Neben diesen bekannten CMP-Sialat-Synthetasen konnte von Frau Dr. Marion Knorst im Arbeitskreis eine neue rekombinante Synthetase mit hoher spezifischen Aktivität zugänglich gemacht werden, die wie erste Untersuchungen zeigten eine breite Substrattoleranz vermuten läßt.⁵²

II. Zielsetzung

Die zunehmende Kenntnis über die Bedeutung sialinsäurehaltiger Glycokonjugate bei zahlreichen physiologischen und pathologisch relevanten Erkennungsprozessen hat den Bedarf an synthetischen Sialinsäuren, Oligosacchariden und Glycokonjugaten für systematische biologische Studien enorm gesteigert. Von besonderem Interesse sind hierbei Sialokonjugate, die strukturmodifizierte Sialinsäureeinheiten beinhalten.

Die bei der Synthese sialinsäurehaltiger Glycokonjugate erforderliche CMP-Aktivierung der Sialinsäurenanaloga verursacht insofern Schwierigkeiten, als daß die hierfür eingesetzten CMP-Neu5Ac-Synthetasen meist aufwendig isoliert werden müssen und zudem in Abhängigkeit von ihrer Herkunft eine zum Teil recht enge Substrattoleranz zeigen. Um einen Ausweg aus dieser Problematik zu schaffen, konnte von Frau Dr. Marion Knorst im Arbeitskreis eine neue rekombinante CMP-Neu5Ac-Synthetase aus *Neisseria meningitidis* Serogruppe B mit Hilfe eines hoch effektiven Überexpressionssystems in *E. coli* erfolgreich produziert werden. Wie erste Untersuchungen im Arbeitskreis zeigten, läßt diese neue Synthetase eine breite Substrattoleranz vermuten; so werden zahlreiche an C5 modifizierte C9-Sialinsäuren als Substrate von diesem Enzym erkannt und umgesetzt. Von besonderem Interesse war es deshalb, ob auch stärker von der *N*-Acetylneuraminsäure als natürlichem Substrat abweichende Sialinsäure-Strukturen von dieser CMP-Sialat-Synthetase als Substrate akzeptiert werden.

Grundvoraussetzung für die Evaluierung der Substrattoleranz dieses Enzyms war daher die Synthese geeigneter, strukturell breit abgewandelter Sialinsäureanaloga.

Einen raschen, schutzgruppenfreien Zugang zu neuen Sialinsäurestrukturen offeriert die in wässrigem Milieu durchführbare Indium-vermittelte Allylierung geeigneter aldehydischer Vorstufen, die zudem auch prinzipiell die Synthese von solchen nicht-natürlichen Derivaten erlaubt, die enzymatisch nicht hergestellt werden können.

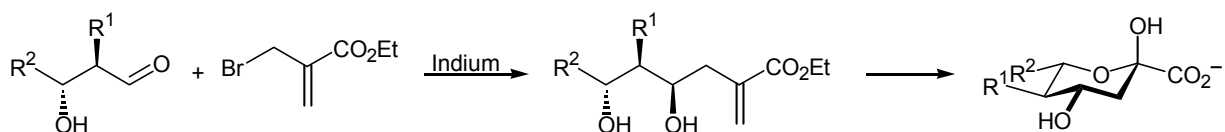


Abb.17: Indium-vermittelte Synthese von Sialinsäureanaloga

Insbesondere die Synthese von Sialinsäuren mit geringer Funktionalitätsdichte wie Seitenketten-verkürzte Analoga (C6- bzw. C7-Sialinsäuren), aber auch Derivate mit neuen Funktionalitäten war von Interesse, da solche Strukturen ein später erfolgreiches Labeling erleichtern würden.

Die für die Synthese verkürzter Sialinsäure-Strukturen erforderlichen aldehydischen Vorstufen sind in der Regel nicht kommerziell verfügbar. Es sollten daher zunächst auch geeignete Methoden gesucht werden, die einen unkomplizierten und vor allem schonenden Zugang zu diesen oft hoch sensitiven Verbindungen erlauben.

In Abhängigkeit der Substrateigenschaften solcher neuen Sialinsäure-Strukturen sollte abschließend getestet werden, ob eine enzymatische CMP-Aktivierung mit Hilfe der rekombinanten CMP-Sialat-Synthetase in Kombination mit einem darauf folgenden enzymatischen Sialyltransfer auf geeignete Akzeptorverbindungen auch im präparativen Maßstab durchführbar ist.

III. Allgemeiner Teil

1. Indium-vermittelte, wässrige Allylierung vom Barbier-Typ

1.1. Einleitung

Seit der Synthese des Diethylzinks – eine der ersten metallorganischen Verbindungen – durch *Frankland* im Jahre 1849,⁷³ sind eine Vielzahl organometallischer Reagenzien hergestellt und auf ihre potentielle Anwendbarkeit für organische Synthesen untersucht worden. Die wichtigste und häufigste Anwendung finden metallorganische Verbindungen in solchen Reaktionen, bei denen neue Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen gebildet werden, wie etwa in Reformatzky-, Grignard- oder auch Aldol-Reaktionen.⁷⁴⁻⁷⁶

Die nucleophile Allyladdition an Carbonylverbindungen stellt eine wichtige Anwendung dar, wobei die Grignard-Reaktion mit Allylmagnesiumbromid mittlerweile zu den Klassikern der metallorganischen Chemie gehört. Neben der Verwendung von Allylmagnesium-Verbindungen sind in neuerer Zeit eine Reihe weiterer allylischer Metallorganyle (insbesondere Si-, Ti- und B-Verbindungen) synthetisiert und untersucht worden.⁷⁷⁻⁸⁰ Alle diese Verbindungen besitzen jedoch speziell für den Einsatz in der Kohlenhydratchemie einen elementaren Nachteil: sie sind zum Teil extrem hydrolyseempfindlich. Diese Hydrolyseempfindlichkeit erfordert zum einen die Verwendung von aprotischen Solventien und zum anderen den Einsatz von Schutzgruppentechniken.

Einen Ausweg aus dieser Problematik bietet die Verwendung relativ “weicher“ Metalle wie Zink, Zinn, Indium, Cadmium oder Blei, da deren Allylverbindungen vom “harten“ Solvens Wasser nur langsam angegriffen werden.⁵⁷

Die Allylierung von Carbonylverbindungen unter Ausbildung von Homoallylalkoholen kann daher bei geeigneter Wahl des metallorganischen Mediators auch in protischen Lösungsmittelsystemen durchgeführt werden.⁵⁴⁻⁵⁷ Wird das metallorganische Allylierungsreagenz nicht wie bei der zweistufigen Grignard-Reaktion isoliert, sondern *in situ* verbraucht, so bezeichnet man die Reaktion als Barbier-Typ-Reaktion.

Basierend auf den Erkenntnissen von *Wolinsky*,⁵³ der 1977 die erste erfolgreiche Barbier-Typ-Allylierung von Carbonylverbindungen im protischen Milieu (95% Ethanol) durch

Verwendung von Zink und Allylbromid erzielen konnte, folgte eine Reihe von Arbeiten, die das große Potential dieses Reaktionstyps erahnen liesen.⁵⁸⁻⁶²

Um befriedigende Reaktionsgeschwindigkeiten erzielen zu können, benötigen Zink-vermittelte Allylierungsreaktionen in der Regel eine zusätzliche Aktivierung, welche durch den Zusatz von Säure (HCl, HBr bzw. NH₄Cl), durch Temperaturerhöhung oder mittels Ultraschall erfolgen kann. Auch die sonochemische Unterstützung ist letztlich auf das damit verbundene Erosionsphänomen zurückzuführen, welches eventuell vorhandene passivierende Oxidschichten oder Verunreinigungen von der Metalloberfläche ablöst und somit neue reaktive Zentren zur Verfügung stellt.⁸¹⁻⁸³

Eine deutliche Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit konnte jedoch auch durch die Verwendung von Zinn oder Indium an Stelle von Zink erzielt werden. Vergleicht man die ersten Ionisierungspotentiale der Metalle miteinander, so ist leicht ersichtlich, warum insbesondere Indium ein vielversprechendes Metall für die Barbier-Typ-Allylierung darstellt. Während Zink ein erstes Ionisierungspotential von 9.39 eV hat, liegt das von Indium bei 5.79 eV und damit im Bereich der reaktiven Alkalimetalle (zum Vergleich: Natrium: 5.12 eV). Im Gegensatz zu den Alkalimetallen verhält sich Indium jedoch gegenüber Wasser und Laugen inert und bildet an der Luft keine Oxide aus.⁶³⁻⁶⁵

Arbeiten von *Li* und *Chan* zeigten 1990 die überragenden Eigenschaften der Indium-vermittelten Barbier-Reaktion deutlich auf.⁶⁶ Wegen der hierbei im Vergleich zu analogen Umsetzungen mit z.B. Zink drastisch erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit wird keine zusätzliche Aktivierung benötigt.

Während besonders Aldehyde (aber auch Ketone) gute Substrate für die Metall-vermittelte Barbier-Typ-Allylierung darstellen, verhalten sich weniger elektrophile funktionelle Gruppen wie Ester-, Carboxy- oder Amidgruppen völlig inert.^{62,64,67} Daher, und weil Indium-vermittelte Allylierungen unter äußerst milden Reaktionsbedingungen durchführbar sind, stellt diese Form der Allylierung vom Barbier-Typ in protischen Lösungsmittelsystemen ein ideales Werkzeug für die Kohlenhydratchemie dar. Die Kompatibilität dieses Reaktionstyps mit einem protischen Solvens – oder sogar Wasser selbst – ist hierbei einer der entscheidenden Vorteile, da auf umständliche Schutzgruppen-manipulationen verzichtet werden kann. Paradebeispiele dieser Methodik stellten die Synthesen von 3-Desoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-2-nonulosonsäure (KDN),^{69,70} *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)^{68,69} sowie 3-Desoxy-D-*manno*-2-octulosonsäure (KDO)⁸⁴ dar.

Die Indium-vermittelte Allylierung zeichnet sich durch hohe chemische Ausbeuten sowie gute Stereo- und Regioselektivität aus, wodurch der Einsatz des relativ kostspieligen Indium-Pulvers zu rechtfertigen ist. Die Verwendung von Indium als Mediator der Allylierung birgt allerdings neben den erwähnten Vorteilen auch Schwierigkeiten. So ist die Abtrennung der im Reaktionsverlauf gebildeten gut wasserlöslichen Indiumsalze⁸⁵ von den in der Regel ebenfalls gut wasserlöslichen Produkten nicht unproblematisch.

Herkömmliche Aufarbeitungsmethoden beinhalten in der Regel immer eine Chromatographie an Kieselgel um reine – und vor allem Indium-freie – Produkte erhalten zu können. Die Chromatographie an Kieselgel erfordert vorab zusätzliche Reinigungsschritte; so kann ein beträchtlicher Anteil der gebildeten Indiumsalze direkt mittels Zentrifugation oder durch Filtration mit Filterhilfsmitteln (z.B. Kieselgur) entfernt werden.^{68,86} Die per Filtration vorgereinigten Produkte können auch mit Acetanhydrid acetyliert werden und in dieser Form an Kieselgel chromatographiert werden, wodurch natürlich einer der elementaren Vorteile der Barbier-Typ-Allylierung in wässrigen Systemen – der Verzicht auf unproduktive Schutzgruppenmanipulationen – seine Bedeutung verliert.

Um die Wirksamkeit möglicher Reinigungsmethoden beurteilen zu können, benötigt man primär ein geeignetes analytisches Verfahren, mit dem auch minimale Mengen Indiumhaltiger Verunreinigungen effektiv nachgewiesen werden können.

Verbindungen des dreiwertigen Indiums, besonders als wässrige Lösung, unterscheiden sich in ihren Eigenschaften nur geringfügig von denen des homologen Aluminiums. Der analytische Nachweis von Indium gelingt daher in Analogie zum Aluminium als Alizarin S-Farblack. Alizarin S (Na-Salz der 1,2-Dihydroxyanthrachinonsulfonsäure) bildet mit In^{3+} einen hellroten, in verdünnter Essigsäure schwerlöslichen Farblack, während die rotviolette Färbung der ammoniakalischen Alizarinlösung beim Ansäuern in gelb umschlägt.⁸⁷ Die Erfassungsgrenze des Alizarin S-Nachweisreagenz liegt bei 0,5 μg für Al^{3+} .⁸⁸ Eine analoge Nachweisempfindlichkeit konnte durch eine entsprechende Verdünnungsreihe auch für In^{3+} bestimmt werden.

Am Beispiel der Indium-vermittelten Allylierung von D-Mannose mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat (**Abb. 18**) wurden nun mögliche Reinigungsmethoden wie Filtration, Zentrifugation und Ionenaustauschchromatographie mit dem Alizarin S-Nachweisreagenz auf ihre Wirksamkeit hin untersucht.

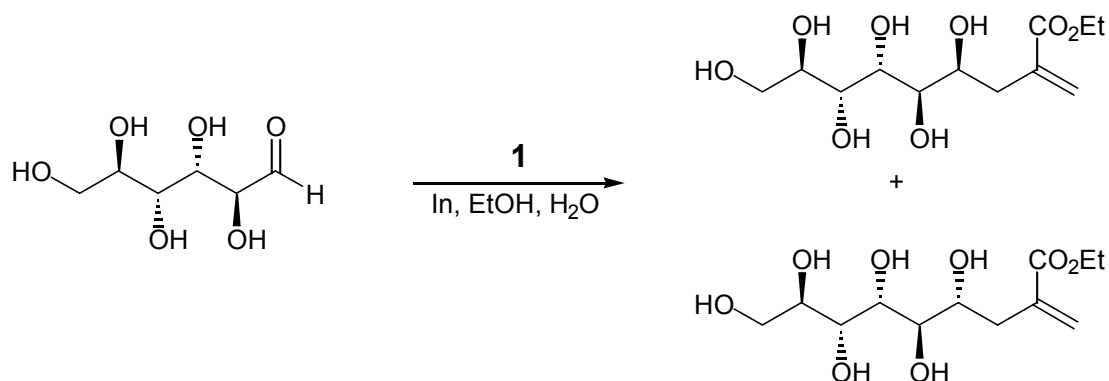


Abb. 18: Indium-vermittelte Allylierung von D-Mannose

Wie im Rahmen dieser Untersuchung gezeigt werden konnte, ist keine vollständige Abtrennung der im Reaktionsverlauf als farbloser Niederschlag anfallenden Indiumsalze von den gewünschten Produkten möglich. Auch bei der Verwendung von Kieselgel, Kieselgur oder Aktivkohle als Filterhilfsmittel konnten keine Indium-freien Produkte erhalten werden.

Die durch einfache Zentrifugation erhaltenen farblosen, klaren Lösungen waren ebenfalls mit Indium verunreinigt. Durch den Zusatz von Filterhilfsmitteln sollten via Zentrifugieren deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden. Es zeigte sich jedoch, daß auch durch Aktivkohle-, Kieselgel- oder Kieselgur-unterstützte Zentrifugation keine quantitative Indiumabtrennung erreicht werden konnte.

Eine häufig angewendete Methode zur Entsalzung von Reaktionsgemischen ist die Ionenaustauschchromatographie. Die Affinität der Ionen zum Ionenaustauscher wird dabei vor allem durch die Ionenladung und den Ionenradius beeinflusst, wobei allgemein bei Kationen eine höhere Ionenladung auch eine höhere Affinität zum Ionenaustauscher bewirkt. Mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie sollte nun eine quantitative Abtrennung der dreiwertigen Indium-Ionen möglich sein. Die Abtrennung Indium-haltiger Verunreinigungen verlief jedoch auch durch den Einsatz von Ionenaustauschern (Dowex 50 WX8, H^+ -Form), sogar in Kombination mit vorausgehender Filtration oder Zentrifugation nicht quantitativ.

Da sich wegen der sehr guten Wasserlöslichkeit dreiwertiger Indium-Ionen eine quantitative Abtrennung des Metalls mittels der aufgeführten Methoden als unmöglich erwies, mußte versucht werden, eine Fällung des Indiums zu erreichen.

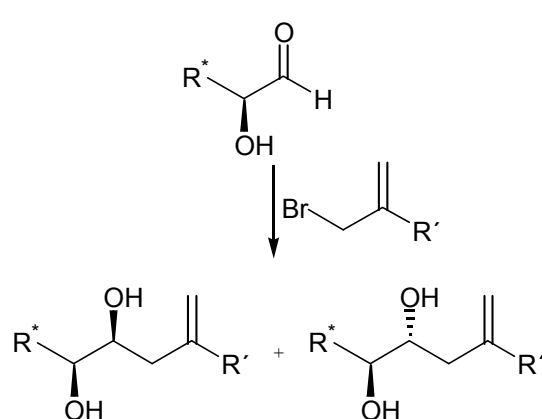
Da sich Verbindungen des dreiwertigen Indiums recht ähnlich zu denen des homologen Aluminiums verhalten, lag der Versuch nahe, das Indium aus der neutralen Lösung als

Indiumphosphat auszufällen und Letzteres dann durch Zentrifugation abzutrennen. Zu diesem Zweck wurde der zunächst saure Reaktionsansatz mit verdünnter Natronlauge vorsichtig neutralisiert und mit Phosphatpuffer (1.M, pH 7.0) im Überschuß (1.2 Äquivalente, im Verhältnis zu der eingesetzten Indiummenge) versetzt. Die ausgefallenen Indiumphosphate wurden anschließend durch Zentrifugation entfernt und man erhielt in der Tat ein Indium-freies Produkt. Bedenken, daß der eingesetzte Phosphatpuffer den qualitativen Indiumnachweis stören und somit ein Indium-freies Produkt nur vortäuschen würde, konnten durch entsprechende Blindproben widerlegt werden. Bei Bedarf konnte der überschüssige Phosphatpuffer anschließend problemlos mittels Ionenaustauschextraktion entfernt werden und man erhielt nach HV-Trocknung reine, Indium-freie Produkte in hohen Ausbeuten (75-90%).⁸⁹

Das hier beschriebene Verfahren erlaubt somit einen schnellen und unkomplizierten Zugang zu Produkten von hoher Reinheit, die in dieser Qualität bislang nur durch weit aufwendigere Chromatographie an Kieselgel erhalten werden konnten.

1.2. Diastereoselektivität der Indium-vermittelten Allylierung

Bei der Addition eines Allyläquivalents an die Carbonylgruppe eines Kohlenhydrates entsteht formal ein Homoallylpolyol mit einem neuen Chiralitätszentrum. Wie Untersuchungen von



Whitesides⁶⁴ und Schmid⁶⁵ zeigen, liefert die Indium-vermittelte Allylierung dabei Produkte mit mittlerer bis sehr guter Diastereoselektivität, wobei das Hauptisomer *threo*-Konfiguration aufweist. Diese asymmetrische Induktion läßt sich mit Hilfe des Cramschen Chelat-Modells erklären.⁹⁰⁻⁹² Enthält die eingesetzte Carbonylverbindung zusätzliche Chiralitätszentren, so

stehen die beiden Halbräume der Carbonylverbindung in diastereotopem Verhältnis zueinander. Bei der Allylierung, die das Prochiralitätszentrum in ein neues Chiralitätszentrum umwandelt, kann das Allylierungsreagenz sowohl von der *re*- als auch von der *si*-Seite angreifen. Die dabei entstehenden diastereotopen Übergangszustände besitzen unterschiedliche Energien.

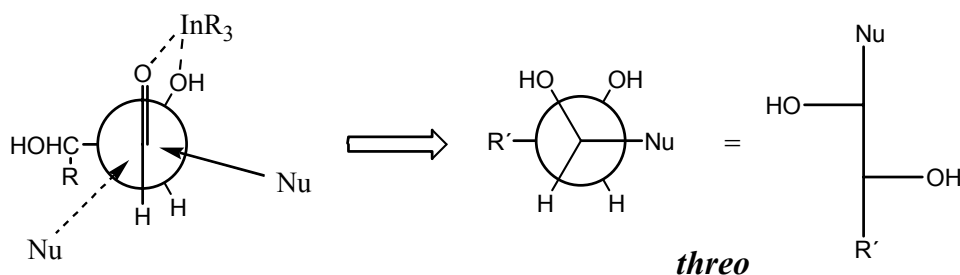


Abb. 19: Asymmetrische Induktion bei α -Hydroxycarbonylverbindungen

Im Verlauf der Reaktion werden deshalb die Diastereomeren in unterschiedlichen Mengen gebildet. Das Auftreten einer asymmetrischen Induktion kann für den Fall der α -Hydroxycarbonylverbindungen genauer begründet werden: Über ein vorgelagertes Gleichgewicht kann sich ein Chelatkomplex ausbilden, der seine konformative Beweglichkeit bezüglich der 1,2-Achse verloren hat und von der sterisch weniger gehinderten Seite unter Ausbildung des anti-Cram-Produkt mit *threo*-Konfiguration angegriffen wird. Je größer die Chelatisierungsfähigkeiten des α -Substituenten neben der Carbonylgruppe sind, desto diastereoselektiver verläuft somit auch die Addition des Allyläquivalents. Aus diesem Grunde kann natürlich auch eine Umkehrung der stereochemischen Verhältnisse erzielt werden, indem die eingesetzte Carbonylverbindung vorab so modifiziert wird, daß sie mit der eingesetzten metallorganischen Verbindung kein cyclisches Chelat bilden kann.⁹³⁻¹⁰³ Erstmals gelang dieses *Schmid*, der eine *erythro*-Selektivität durch den Einsatz isopropyliden-geschützter Aldosen induzieren konnte.¹⁰⁴

1.2.1. Allylierung von D-Mannose mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat

Mittels Indium-vermittelter Allylierung von D-Mannose mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat **1** sollten entsprechend den literaturbekannten Umsetzungen von D-Mannose mit Methyl- α -(brommethyl)-acrylat⁷⁰ (72% Ausbeute; *threo/erythro* = 6/1) bzw. α -(Brommethyl)-acrylsäure⁶⁹ (75% Ausbeute; *threo/erythro* = 5/1) die beiden diastereomeren Allylierungsprodukte **2** und **3** in hoher Ausbeute zugänglich sein (**Abb. 20**). Die hier bevorzugte Verwendung des Ethylesters **1** als Allylierungsreagenz begründet sich in dessen

leichter Zugänglichkeit aus preiswerten Grundchemikalien. Die Synthese gelingt nach literaturbekannten Methoden aus (Para)Formaldehyd und Phosphonoessigsäuretriethylester über Ethyl- α -(hydroxymethyl)-acrylat als Zwischenstufe in Gesamtausbeuten von 65%.^{105,106}

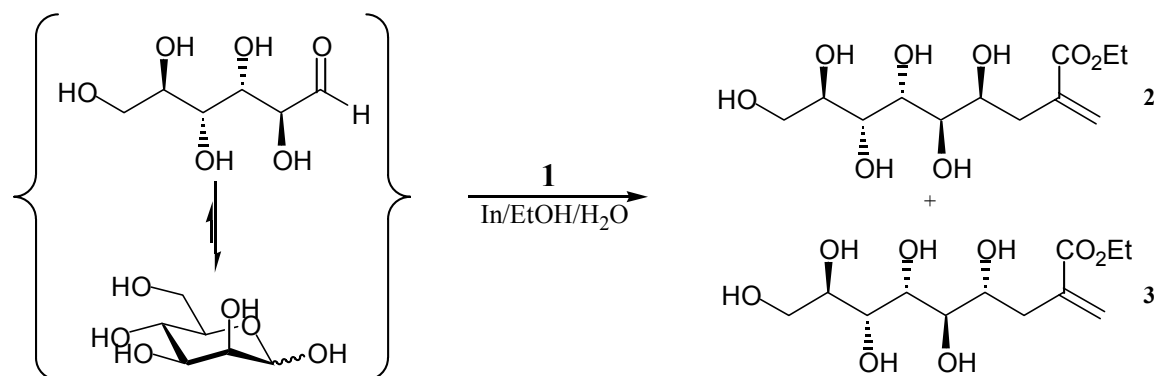


Abb. 20: Indium-vermittelte Allylierung von D-Mannose unter neutralen Bedingungen

Entsprechende Umsetzungen in einem neutralen, wässrigen System lieferte erwartungsgemäß ein Gemisch der 4-epimeren Ester **2** und **3** (79% Ausbeute; *threo/erythro* = 6/1). Die beobachtete asymmetrische Induktion wird hierbei durch die Ausbildung eines fünf-gliedrigen-Chelats zwischen dem Allyl-Indium-Reagenz und D-Mannose (Aldehydsauerstoff und α -Hydroxygruppe), auf Grundlage des Cram'schen Chelat-Modells erklärt.

Basierend auf der Annahme, daß eine Aldehyd-Protonierung den elektrophilen Charakter der Aldehyd-Gruppe erhöht und somit deutlich verkürzte Reaktionszeiten liefern sollte, wurden entsprechende Umsetzungen in Analogie zu Untersuchungen von *Whitesides* (Allylierung von α -Aminozuckern unter aciden Bedingungen)^{64,68,86} in einem aciden Lösungsmittelsystem (EtOH/0.1M HCl = 7/1) durchgeführt.

Zum einen wurde erwartungsgemäß eine deutliche Erhöhung der Umsatzgeschwindigkeit beobachtet, aber zum anderen zeigte die DC-Kontrolle der Reaktion die Bildung eines Produktgemisches (1:1) an, das nicht dem erwarteten Gemisch der diastereomeren Ester **2** und **3** entsprach. NMR-spektroskopische Untersuchungen des Rohproduktes bestätigten die mittels DC gemachten Beobachtungen. So konnten zwar im ^1H -NMR-Spektrum zwei Sätze olefinischer Protonen als 1:1-Gemisch identifiziert werden, aber das Integrationsverhältnis der Esterprotonen zu den olefinischen Protonen war mit 2.5:2 deutlich kleiner als das erwartete Verhältnis von 5:2. Desweiteren schien die beobachtete Aufspaltung der Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum mit bis zu 4 ppm für diastereomere Verbindungen deutlich zu groß zu sein.

Eine Klärung dieser Ergebnisse sollte die Frage nach möglichen Neben- bzw. Folgereaktionen der Allylierung liefern. Speziell in dem hier gewählten sauren Milieu (pH 1-2) können zwei elementare Nebenreaktionen ablaufen: Einerseits würde die saure Hydrolyse der gebildeten Ester die entsprechenden freien Säuren **4** und **5** liefern, während andererseits eine Lactonisierung unter Ausbildung von **6** und **7** ablaufen würde. Die Lactonbildung wäre dabei sowohl als Umesterung direkt aus dem entsprechenden Ester als auch über die Zwischenstufe der Säure möglich.

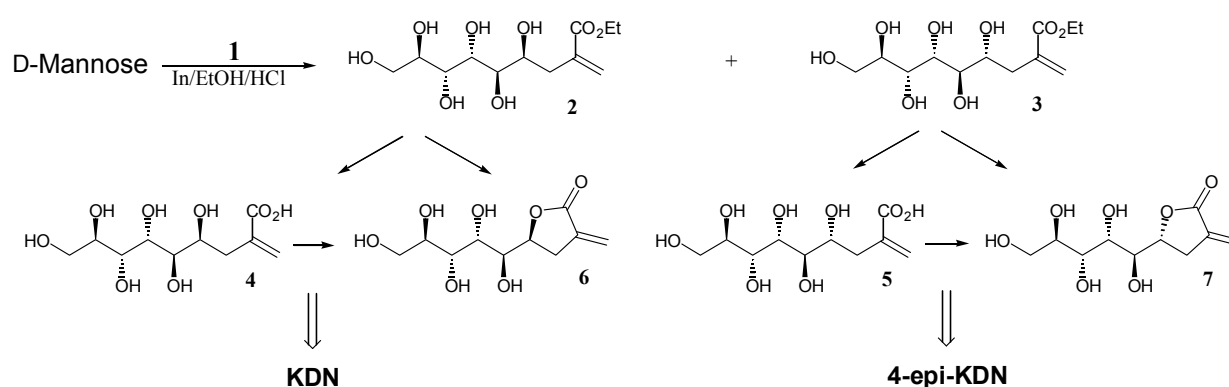


Abb. 21: Mögliche Folgereaktionen der Allylierung von D-Mannose mit **1**

Eine Klärung der Problematik erbrachten die Folgereaktionen des Gemisches durch Ozonolyse und Hydrolyse. Ausgehend von einem 4-epimeren Ester-Gemisch wäre die Bildung eines Gemisches aus KDN:4-epi-KDN in analogem Verhältnis zu erwarten.

Entsprechende Umsetzungen lieferten jedoch zweifelsfrei nur 3-Desoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonsäure (KDN) **8** als alleiniges, diastereomerenreines Produkt in über 75% Gesamtausbeute.

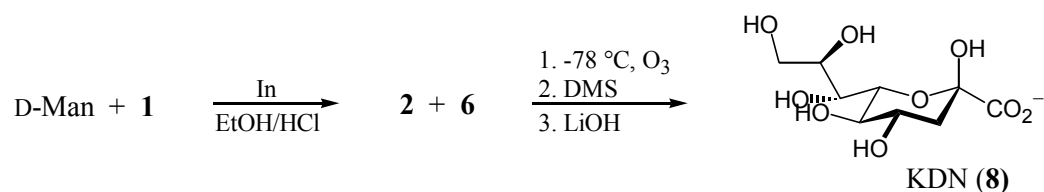


Abb. 22: KDN-Synthese

Bei dem durch Allylierung im aciden Milieu von D-Mannose erhaltenen Produktgemisch konnte es sich somit nicht um ein Gemisch der diastereomeren Ester **2** und **3** handeln. Weitere Experimente konnten diese Ergebnisse untermauern. Da eine Trennung des Reaktionsgemisches der Allylierung durch einfache Chromatographie nicht erreicht werden konnte, wurde das Gemisch zur Erzielung einer besseren Trennleistung an Kieselgel derivatisiert. Nach Peracetylierung konnte das Produktgemisch durch Chromatographie an Kieselgel tatsächlich getrennt und mittels NMR- und MS-Analyse, sowie durch den Vergleich mit Literaturdaten als Ethyl-4,5,6,7,8,9-hexa-*O*-acetyl-2,3-didesoxy-2-methylen-D-*glycero*-D-*galacto*-nononat **9** (Derivat von **2**) sowie 5,6,7,8,9-Penta-*O*-acetyl-2,3-didesoxy-2-methylen-D-*glycero*-D-*galacto*-nononsäure-1,4-lacton **10** (Derivat von **6**) identifiziert werden.

Wie diese Untersuchungen zeigten, liefert die Indium-vermittelte Allylierung von D-Mannose mit Ethyl- α -(bromomethyl)-acrylat unter aciden Bedingungen somit nicht das erwartete Gemisch der 4-epimeren Ester (**2/3**), sondern vielmehr ein Gemisch aus Ester **2** und dem stereochemisch identisch konfigurierten Lacton **6**. Ausgehend von diesem Gemisch bieten sich verschiedene Möglichkeiten an, um ein einheitliches Produkt zu erhalten. So sollte das Produktgemisch vollständig sowohl in den Ester **2** als auch in das Lacton **6** überführbar sein. Auch die simultane Hydrolyse beider Verbindungen unter Ausbildung der freien Säure **4** ist denkbar. Für präparative Zwecke war eine Vereinheitlichung des Produktgemisch auf dieser Stufe jedoch nicht erforderlich, da die benötigten Folgereaktionen selektiv ein einheitliches Produkt liefern.

1.2.2. Allylierung von D-Arabinose mit Ethyl- α -(bromomethyl)-acrylat

Anhand der Allylierung von D-Arabinose mit Ethyl- α -(bromomethyl)-acrylat sollte die Abhängigkeit der Stereoselektivität vom Solvens studiert werden können. Wie Untersuchungen von *Whitesides et al.*⁶⁴ zeigten, liefert die Indium-vermittelte Allylierung von D-Arabinose mit Ethyl- α -(bromomethyl)-acrylat in einem Ethanol-Wasser-Gemisch (10:1) ohne Säure-Zusatz bei Raumtemperatur ein Gemisch der beiden diastereomeren Ethylacrylat-Addukte **11** und **12** mit einem Diastereomerenverhältnis (*threo/erythro*) von 4:1 sowie Ausbeuten von 73%.

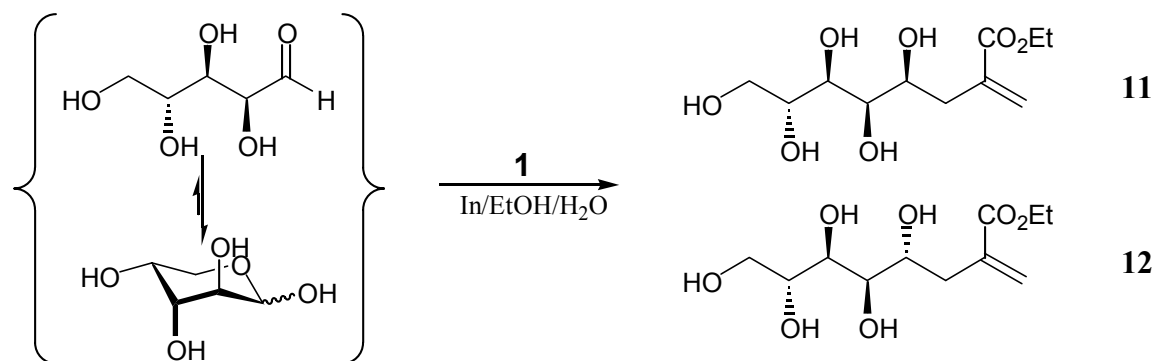


Abb. 23: Indium-vermittelte Allylierung von D-Arabinose unter neutralen Bedingungen

Eigene Umsetzungen in einem Säure-freien Ethanol-Wasser-Gemisch bestätigten diese Ergebnisse, wobei in 64% Ausbeute ein 4:1-Gemisch der diastereomeren Verbindungen **11** und **12** erhalten wurde.¹⁰⁷

Auf Basis der Erkenntnisse aus den analogen Umsetzungen mit D-Mannose wurden weitere Allylierungsversuche durchgeführt. Da zu vermuten war, daß die Lactonbildung primär auf das saure Reaktionsmedium zurückzuführen ist, wurden die Umsetzungen nicht in einem Ethanol-Wasser-Gemisch, sondern in einem Ethanol-Salzsäure-Gemisch durchgeführt. Wie diese Versuche zeigten, verläuft die Allylierung von D-Arabinose im aciden Milieu tatsächlich ebenfalls unter Lactonbildung, wobei Gemische der stereochemisch äquivalenten Verbindungen Ethyl-2,3-didesoxy-2-methylen-D-*gluco*-octanat **11** und 2,3-Didesoxy-2-methylen-D-*gluco*-octonsäure-1,4-lacton **13** erhalten werden konnten.

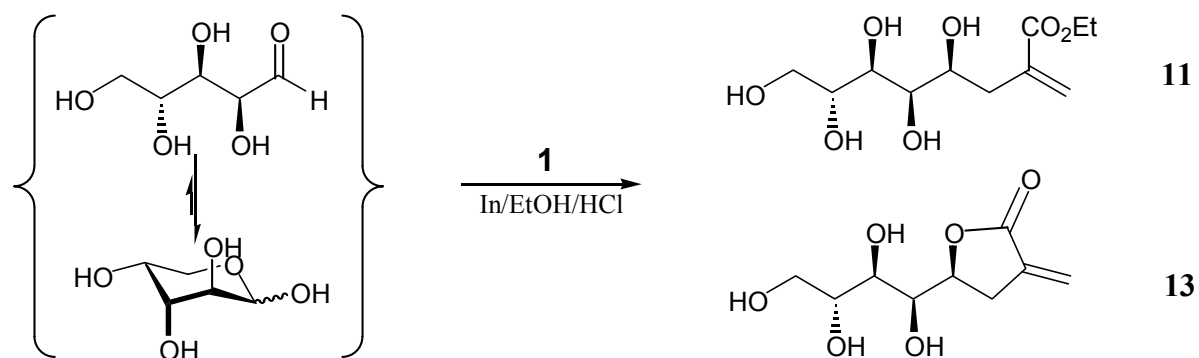


Abb. 24: Indium-vermittelte Allylierung von D-Arabinose unter aciden Bedingungen

Die Identifizierung der Produkte erfolgte in Analogie zu der Vorgehensweise bei den entsprechenden Mannoseverbindungen durch NMR- und MS-Analyse der peracetylierten Derivate **15** und **16**, welche durch Chromatographie an Kieselgel getrennt wurden. Die NMR-spektroskopische Analyse des Produktgemisches zeigte neben den identifizierten Verbindungen **11** und **13** keine Anteile der 4-epimeren Verbindungen **12** bzw. **14** an. Die Indium-vermittelte Allylierung von D-Arabinose mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat verlief also unter den sauren Bedingungen ebenfalls hoch stereoselektiv unter Bildung des Ester-Lacton-Gemischs mit Gesamtausbeuten von bis zu 78%.

1.3. Synthese von Seitenketten-verkürzten KDN-Derivaten

Auf der Grundlage der bei der Indium-vermittelten Allylierung von D-Mannose bzw. D-Arabinose gewonnenen Ergebnissen, sollte nun auch die Synthese von Seitenketten-verkürzten KDN-Derivaten aus kommerziell erhältlichen Aldosen möglich sein. So war die Synthese der C8/C7/C6-analogen KDN-Derivate aus den entsprechenden C5/C4/C3-analogen Aldosen denkbar (**Abb. 25**).

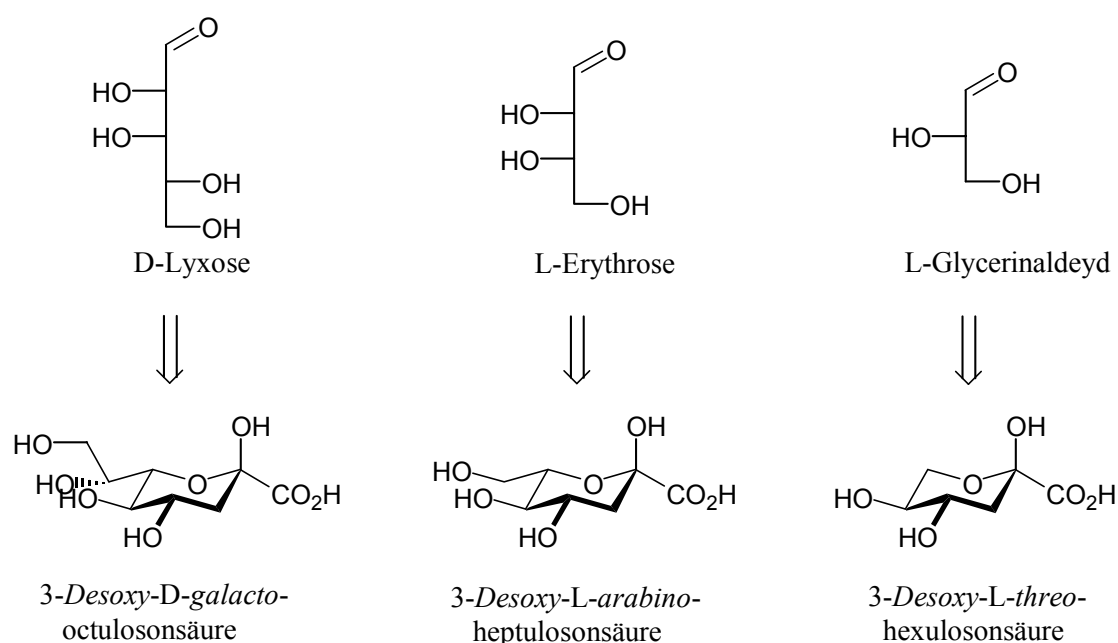
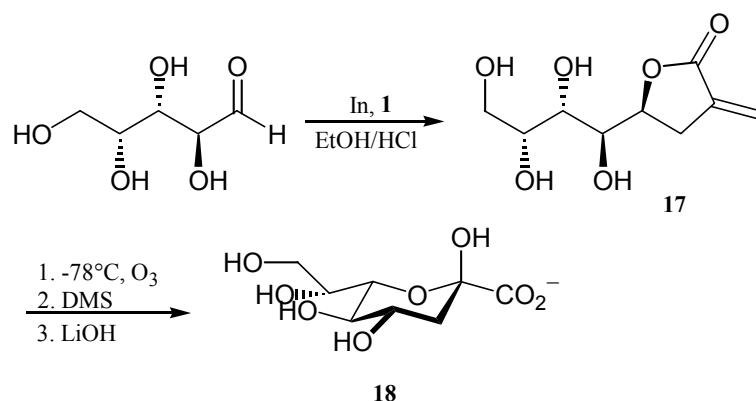


Abb. 25: Synthese der Seitenketten-verkürzten KDN-Analoga

Allylierung von D-Lyxose mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat

Die Indium-vermittelte Allylierung von D-Lyxose mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat verlief



unter aciden Bedingungen im Ethanol-HCl-Gemisch erwartungsgemäß vollständig diastereoselektiv, jedoch statt eines Ester-Lacton-Gemisches, wurde hier ausschließlich das Lacton **17** erhalten. Ozonolyse von **17** mit anschließender Hydrolyse

und des generierten Oxolactons lieferte die 3-Desoxy-D-*galacto*-octulosonsäure **18** (4,6-bisepi-KDO) in einer Gesamtausbeute von 65%.

Allylierung von D-Erythrose mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat

Die Indium-vermittelte Allylierung von L-Erythrose – kommerziell nur als 40%-Sirup erhältlich – mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat verlief trotz der nur begrenzt kontrollierbaren Qualität des eingesetzten Aldehyds problemlos unter Ausbildung des entsprechenden Ethylesters **19**. Ozonolyse des Allylierungsprodukt gefolgt von Hydrolyse der Estergruppierung lieferte mit Gesamtausbeuten von nahezu 70% die entsprechende Sialinsäure **20** (3-Desoxy-D-*arabino*-heptulosonsäure).

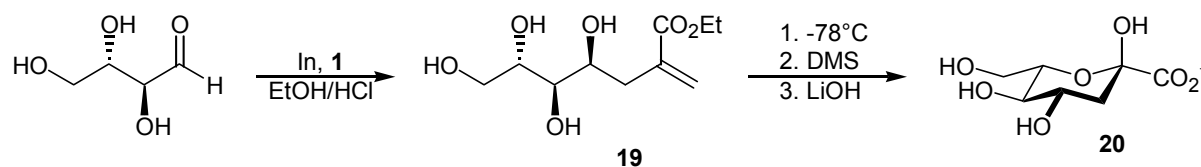
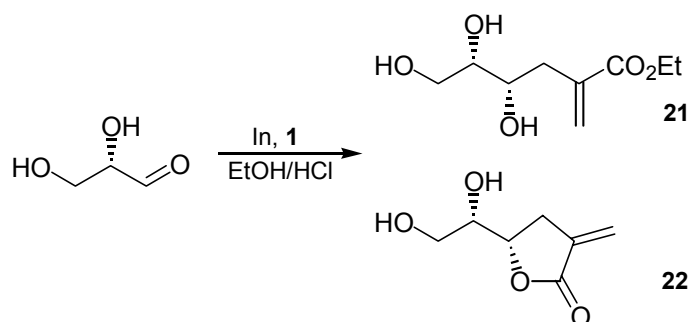


Abb. 26: Synthese von 3-Desoxy-D-*arabino*-heptulosonsäure **20**

Allylierung von L-Glycerinaldehyd mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat

Durch Addition von Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat an L-Glycerinaldehyd sollte entsprechend nach Ozonolyse und Hydrolyse die C6-Sialinsäure 3-Desoxy-L-threo-hexulosonsäure zugänglich sein. Der primäre Reaktionsschritt, die Indium-vermittelte Allylierung, lieferte ein hoch sensitives Produktgemisch von Ester **21** und Lacton **22**. Die erhaltenen, sehr



reaktiven Allylierungsprodukte neigten dazu, spontan zu einer nicht näher definierbaren gallert-artigen Masse zu polymerisieren. Aus diesem Grunde wurde zum einen die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches unter exakter Kontrolle des pH-Wertes

(pH 7) durchgeführt, zum anderen das erhaltene Produktgemisch direkt der Ozonolyse unterworfen. Die Einhaltung eines neutralen pH-Wertes ist insofern unbedingt erforderlich, als schon Spuren von Säure Folgereaktionen wie Dehydratisierung oder auch kationische Polymerisation katalysieren können. Die Hydrolyse des erhaltenen Ozonolysegemisches erfolgte nach Standardbedingungen, wobei jedoch eine deutlich verlängerte Reaktionszeit beobachtet wurde. Während der Keto-Ester **23** problemlos hydrolysiert werden konnte, zeigte sich das erhaltene Keto-Lacton **24**, vermutlich wegen der ausgeprägten Keto-Enol-Tautomerie, als wesentlich unreaktiver gegenüber der basischen Hydrolyse. Unter Einhaltung derart kontrollierter Randbedingungen ließ sich die C6-Sialinsäure **25** dann ausgehend von L-Glycerinaldehyd mit guten Gesamtausbeuten von 76% synthetisieren.

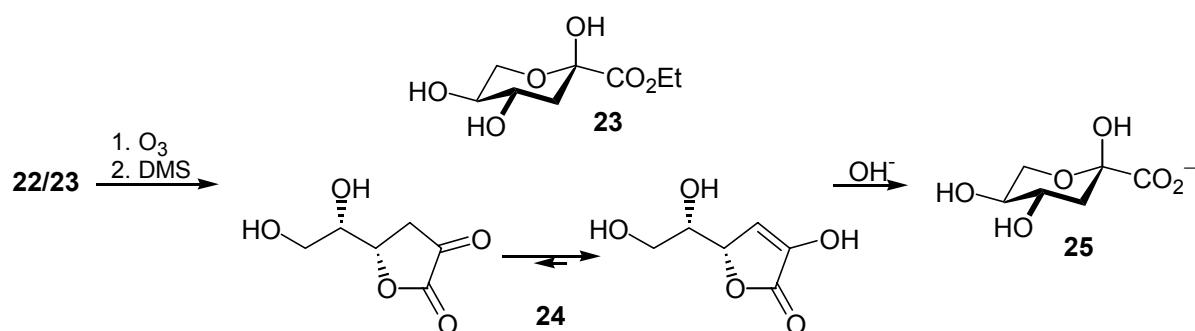


Abb. 27: Synthese von 3-Desoxy-L-threo-2-hexulosonsäure **25**

2. Synthese von seitenkettenverkürzten Sialinsäure-Derivaten

2.1. Einleitung

Die seitenkettenverkürzter KDN-Derivate waren also ausgehend von den kommerziell erhältlichen C3/C4/C5-Aldosen über die etablierte Reaktionabfolge (Allylierung, Ozonolyse, Hydrolyse) in guten bis sehr guten Ausbeuten zugänglich. Entsprechend kurzkettige 2-Amino-2-desoxy-aldosen sind sowohl chemisch als auch konfiguratativ vergleichsweise sehr instabil^{108,109} und aus diesem Grunde kommerziell nicht erhältlich. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher nach Möglichkeiten gesucht werden, entsprechende 2-Amino-2-desoxy-aldosen aus stabilen Vorstufen so zu generieren, daß sie im Idealfall direkt, d.h. ohne langwierige Aufreinigungsprozesse, der Indium-vermittelten Allylierung mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat unterworfen werden können.

2.2. α -Aminoaldehyde

α -Aminoaldehyde stellen aufgrund ihrer vielfältigen präparativen Verwendbarkeit – als Ausgangsverbindungen für Aldolreaktionen,¹¹⁰ Diels-Alder-Cycloadditionen,¹¹¹ Wittig-Typ-Reaktionen,¹¹² metallorganische Reaktionen¹¹³ oder auch bei der Totalsynthese von Naturstoffen¹¹⁴ – eine häufig untersuchte Substanzklasse dar.¹⁰⁸ Da α -Aminoaldehyde jedoch zum einen chemisch instabil sind und zum anderen zur Racemisierung neigen, bietet sich der Einsatz dieser Substanzklasse insbesondere dann an, wenn sie *in situ* generiert werden können.

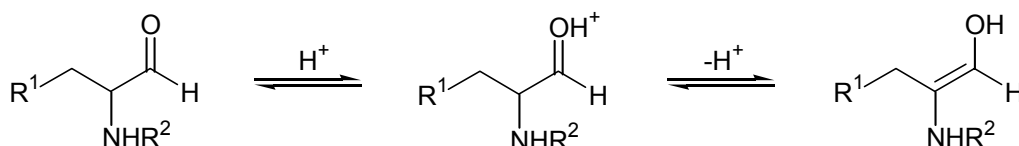


Abb. 28: Chemische und konfigurative Labilität von α -Aminoaldehyden

α -Aminoaldehyde werden üblicherweise aus den analogen α -Aminosäuren synthetisiert, wobei in einer komplexen Reaktionsfolge primär die freie Säurefunktion verestert wird, worauf der erhaltene α -Aminosäureester prinzipiell entweder direkt zum entsprechenden Aldehyd oder zum analogen Alkohol reduziert werden kann. Schlechte chemische Ausbeuten und enorme Probleme bei der Produktisolierung machen jedoch die direkte Reduktion zum Aldehyd äußerst unattraktiv, so daß in der Regel der Umweg über den korrespondierenden Alkohol mit anschließender milder Oxidation zum gewünschten Aldehyd erfolgt.^{115,116}

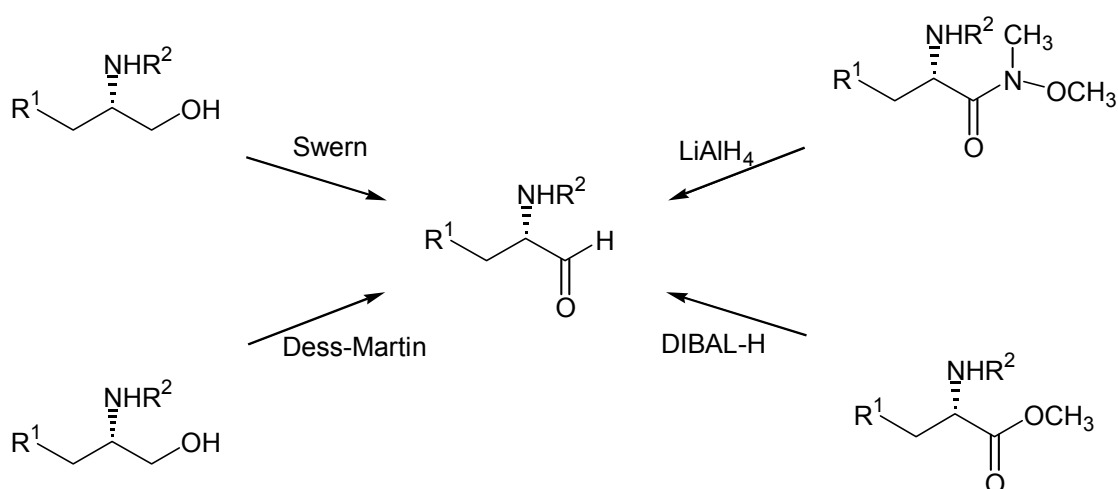


Abb. 29: Methoden zur Synthese von α -Aminoaldehyden¹¹⁷

Unabhängig vom gewählten Reaktionsweg bedarf es jedoch in allen Fällen zumindest einer Flash-Chromatographie an Kieselgel, um hinreichend reine Produkte zu isolieren. Einen direkten Zugang zu α -Aminoaldehyden ohne Bildung von störenden Nebenprodukten ermöglicht die Verwendung olefinischer Vorstufen, die mittels Ozonolyse quantitativ in die entsprechenden Aldehyde überführbar sind. So gelingt nach *Whitesides et al.* die Synthese von 2-Azido-3-hydroxypropanal durch Epoxidierung von Zimtaldehyd mit einem Schwefel-Ylid, Öffnung des Epoxids mit Natriumazid und Ozonolyse in guter Ausbeute.¹¹⁸

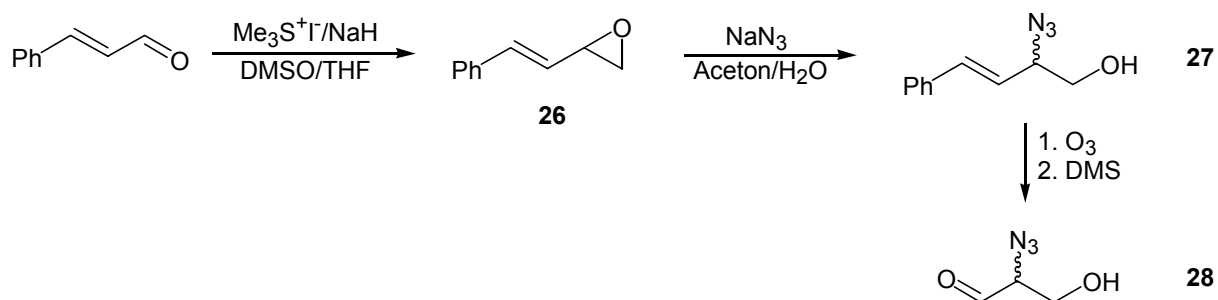


Abb. 30: Synthese des Azidoaldehyds **28**¹¹⁸

Solche styrylischen Vorstufen sind chemisch stabil und besitzen – im Vergleich zu den analogen allylischen Derivaten – wegen der mit dem Aromaten konjugierten Doppelbindung lediglich eine geringe Neigung [3,3]-sigmatrope Umlagerungen einzugehen, was ihre Lagerfähigkeit deutlich erhöht.^{119,120}

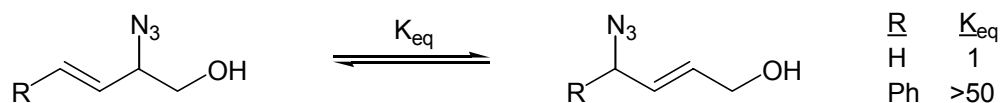


Abb. 31: Gleichgewichtslage allylischer und styrylischer Derivate zu Aza-Cope-Umlagerungen

Das nach *Whitesides et al.* synthetisierte olefinische Azid **27** konnte mit Triphenylphosphin zum korrespondierenden freien Amin **29** reduziert werden, das nun nach Belieben in die gewünschten *N*-Derivate überführt werden konnte.

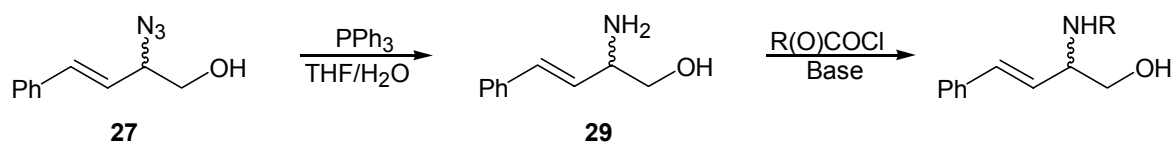


Abb. 32: *N*-Derivatisierung ausgehend vom Azid **27**

2.3. C6-Sialinsäurederivate

Die kürzesten C6-Sialinsäurederivate sollten durch eine Indium-vermittelte Allylierung von entsprechenden *N*-derivatisierten 2-Amino-2-desoxy-glycerinaldehyd-Derivaten mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat und anschließender Ozonolyse und Hydrolyse zugänglich sein.

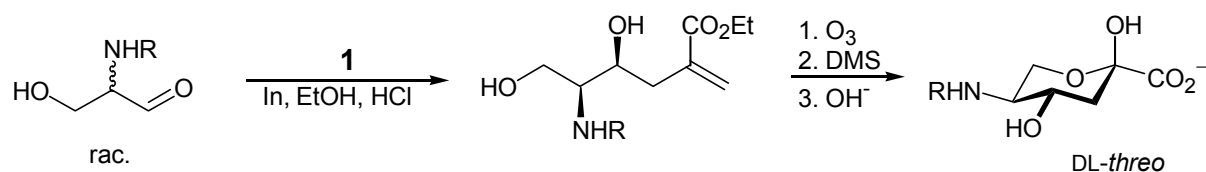


Abb. 33: Synthese von C6-Sialinsäurederivaten

Eine breite Variation des Restes R am Stickstoff war hierbei besonders wünschenswert, da mit solchen modifizierten C6-Sialinsäuren das synthetische Potential der CMP-Sialat-Synthetase rasch näher eruiert werden könnte.

Die Synthese von am Stickstoff modifizierten Sialinsäuren ist prinzipiell auch über Reduktion der analogen 5-Azido-5-desoxy-neuraminsäure und anschließende Derivatisierung auf der spätest möglichen Stufe denkbar.

Ozonolyse des Olefins **27** und anschließende Indium-vermittelte Allylierung des Azidaldehyds **28** mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat lieferte nach erneuter Ozonolyse den Ethylester **31** mit Gesamtausbeuten von 64%.

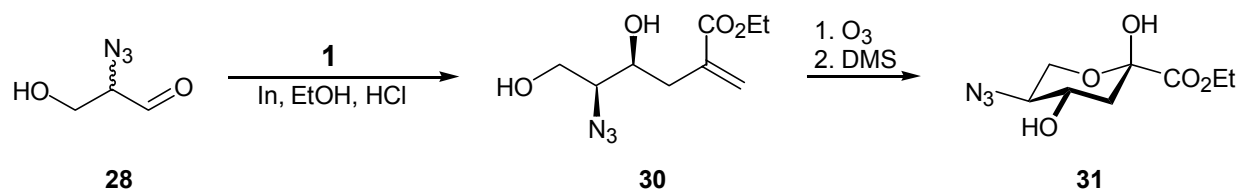


Abb. 34: Synthese des Hexulosonsäureesters **31** (rac.)

Die Reduktion der Azidgruppe lieferte jedoch weder mit Triphenylphosphin noch mit Wasserstoff über Pd/C das freie Amin **32**, sondern es erfolgte vielmehr Cyclisierung über den Stickstoff unter Ausbildung eines komplexen Produktgemisches, welches mit Acetanhydrid in

guten Ausbeuten unter Eliminierung in das Pyrrol-Derivat **33** (5-Acetoxymethyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäureethylester) überführbar war.

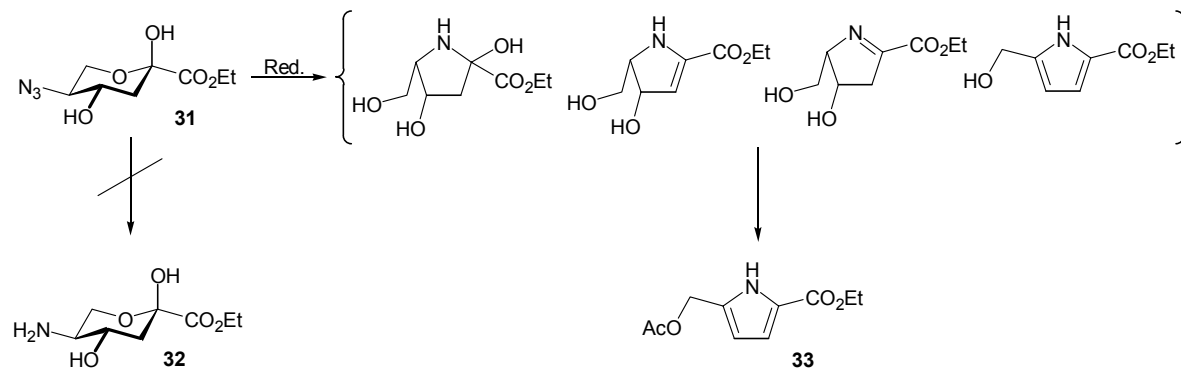


Abb. 35: Reduktion der Azid-Gruppe in **31**

Analoge Reduktionsversuche des *O*-acetyl-geschützten Derivats von **31** verliefen ebenfalls nur unter Bildung des Pyrrol-Derivats **33**. Die Reduktion der Azidgruppe und anschließende Derivatisierung des freien Amins mußte somit vor der Indium-vermittelten Allylierung erfolgen, idealerweise auf der Stufe des Olefins, da hier die Bildung chemisch stabiler, und evtl. auch kristalliner Derivate erwartet werden konnte.

Das in kristalliner Form isolierbare olefinische Amin **29** stellte in der Tat eine hervorragende Ausgangsbasis zur Synthese der gewünschten 2-Amino-2-desoxy-glycerinaldehyd-Derivate dar. Nach gängigen Literaturverfahren konnten die in **Tabelle 1** aufgeführten 2-Amino-4-phenyl-3-buten-1-ol-Derivate des Amins **29** hergestellt und nach Chromatographie an Kieselgel in kristalliner Form erhalten werden.

Tabelle 1: *N*-Derivatisierung von Amin **29**

Verbindung	Nummer	Menge	Ausbeute
<i>N</i> -Ac-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol	34	0.90 g	94%
<i>N</i> -PhAc-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol	35	1.65 g	84%
<i>N</i> -Trityl-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol	36	1.18 g	58%
<i>N</i> -Fmoc-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol	37	1.00 g	87%
<i>N</i> -Cbz-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol	38	2.14 g	72%
<i>N</i> -Boc-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol	39	0.96 g	76%

Ausgehend von den kristallinen, olefinischen Amin-Derivaten konnten die entsprechenden 2-Amino-2-desoxy-glycerinaldehyd-Derivate erwartungsgemäß leicht mittels Ozonolyse generiert werden. Nach reduktiver Behandlung der Ozonolyseansätze mit Dimethylsulfid konnten die so erhaltenen Aldehyde ohne chromatographische Aufreinigung direkt der C-C-Kettenverlängerung mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat unterworfen werden. Der bei der Ozonolyse von Styrylsystemen bei reduktiver Aufarbeitung stöchiometrisch anfallende Benzaldehyd kann hierbei im Gegensatz zu Formaldehyd, der bei der Spaltung vinyli-scher Doppelbindungen entsteht, leicht als Azeotrop mit Wasser entfernt werden. Wie zügig durchgeführte NMR-Messungen am Beispiel des 2-Azido-2-desoxy-glycerinaldehyd zeigten, fällt der Aldehyd in hoher Reinheit in hydratisierter Form an, während nach Chromatographie an Kieselgel partielle Zersetzung beobachtet wurde.

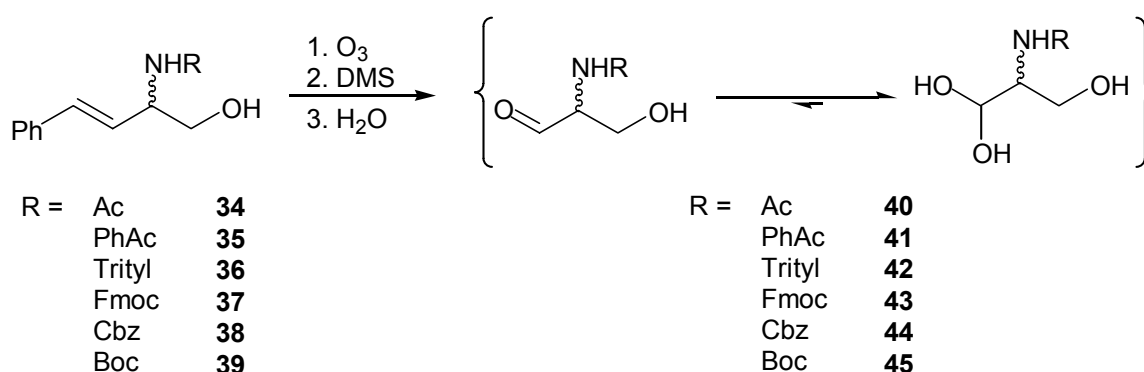


Abb. 36: Freisetzung der 2-Amino-2-desoxy-glycerinaldehyd-Derivate mittels Ozonolyse

Die Indium-vermittelte Allylierung der erhaltenen Aldehyde (als Aldehydhydrate) mit **1** verlief unter den bewährten aciden Bedingungen mit den Aldehyden **40**, **41**, **43** und **44** glatt und mit guten bis sehr guten Ausbeuten, während sowohl die Trityl- als auch die Boc-Schutzgruppe der Aldehyde **42** und **45** durch Säureeinwirkung (teilweise) gespalten wurde und die Komplexität der hierbei erhaltenen Reaktionsgemische keine chromatographische Isolierung der gewünschten hoch empfindlichen Zielverbindungen erlaubte.

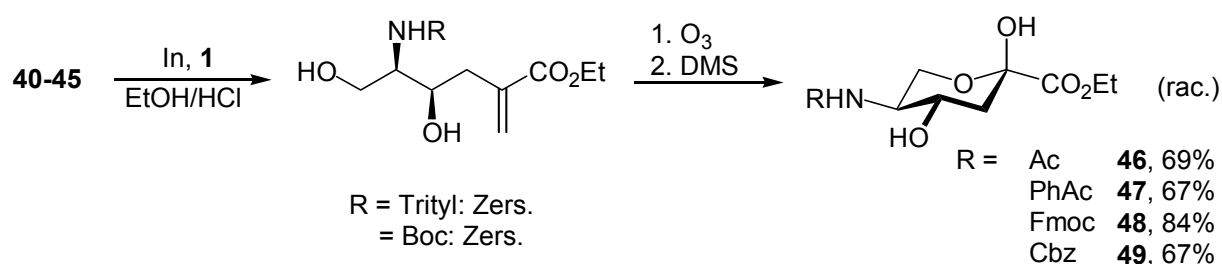


Abb. 37: Synthese der Sialinsäureester **46-49** (rac.)

Die bei der Allylierung erhaltenen, chemisch hoch empfindlichen α -Methylenester wurden nach Extraktion aus dem Reaktionsgemisch direkt der Ozonolyse unterworfen. Die chemisch deutlich stabileren α -Ketoester (**46-49**) konnten schließlich nach Chromatographie an Kieselgel rein isoliert werden. Die auf diesem Wege synthetisierten C6-Sialinsäureester (**31**, **46-49**) waren unter milden Bedingungen (3-4 Äquivalente wäss. LiOH) leicht hydrolysierbar, wobei in jedem Falle darauf zu achten war, daß nach Hydrolyse und Neutralisation mit saurem Kationaustauscher nicht die freien Säuren, sondern die entsprechenden Li-Salze isoliert wurden. Der zwar relativ schwache, aber nicht zu vernachlässigende acide Charakter der Sialinsäuren genügt, um mögliche Folgereaktionen wie etwa eine Dehydratisierung zu initiieren.

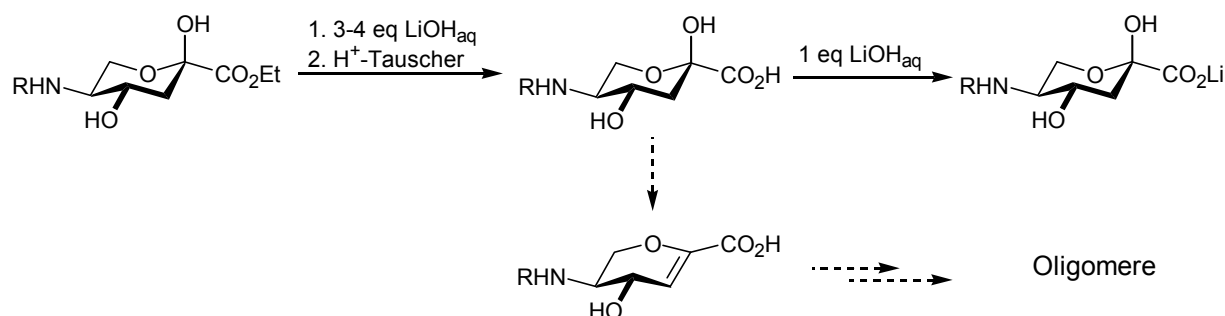


Abb. 38: Hydrolyse der Sialinsäureester und mögliche Nebenreaktionen

Die erste, jüngst veröffentlichte Indium-vermittelte Synthese eines C6-Sialinsäureesters verdeutlicht die Vorteile der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Syntheseroute. So bedarf es bei dem von *Halcomb et al.* vorgestellten Synthesepfad sowohl bei der Synthese der aldehydischen Vorstufe, die aus einem Serin-Derivat aufgebaut wird, als auch bei der

eigentlichen Indium-vermittelten Reaktion aufwendiger Schutzgruppenmanipulationen mit der Folge einer deutlich höheren Stufenzahl sowie insgesamt geringeren Ausbeuten.¹²¹

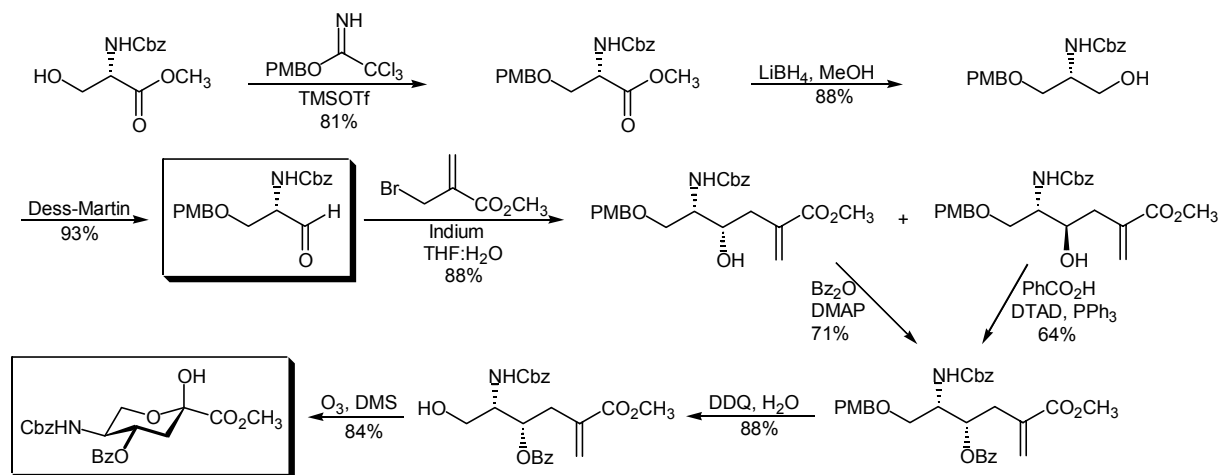


Abb. 39: Synthese eines geschützten C6-Sialinsäureesters nach *Halcomb*¹²¹

Mit der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Reaktionssequenz gelingt dagegen der rasche Zugang zu den neuen Sialinsäurestrukturen **50-54** (rac.) ausgehend von dem leicht aus preiswerten Grundchemikalien zugänglichen Acrylsäureester **1** und dem in zwei Stufen aus Zimtaldehyd synthetisierbaren Azid **27**, ohne daß auf aufwendige Schutzgruppentechniken zurück gegriffen werden muß.

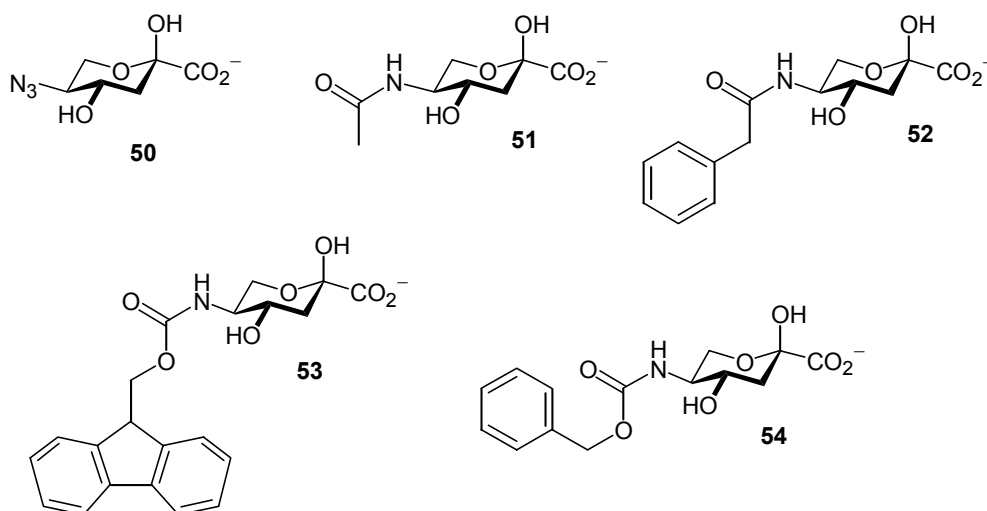
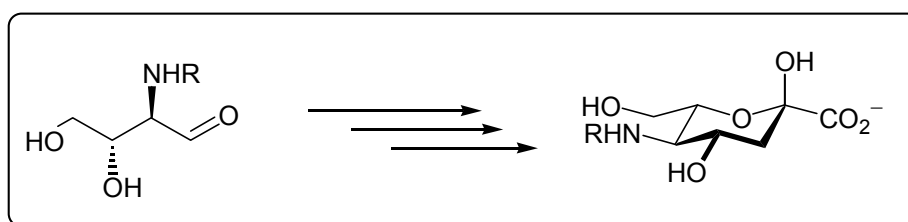


Abb. 40: C6-Sialinsäuren **50-54**

Eine Racematspaltung der synthetisierten Sialinsäurederivate ist wegen der freien Säurefunktion mittels optisch aktiver Basen denkbar, jedoch weder für die Evaluierung der Substrattoleranz der CMP-Sialat-Synthetase noch für die Synthese entsprechender Sialokonjugate notwendig.

2.4. C7-Sialinsäurederivate

In Analogie zu der Indium-vermittelten Allylierung des C4-Bausteins Erythrose mit Ethyl- α -(brommethyl)-acrylat, sollte mit dem entsprechenden 2-Amino-Derivat ein Zugang zu den homologen C7-Sialinsäure-Analoga möglich sein.



N-Funktionalisierte 2-Amino-2-desoxy-erythrose-Derivate sollten wieder aus praktischen Erwägungen ausgehend von der entsprechenden Azidverbindung zugänglich sein, welche selbst aus olefinischen Vorstufen generiert werden sollte. Eine Derivatisierung am Stickstoff würde dabei sinnvollerweise schon auf der chemisch stabilen olefinischen Vorstufe erfolgen, da bei der Reduktion von 2-Azido-2-desoxy-erythrose im Hinblick auf die chemische Labilität der Aldose sowohl unerwünschte Nebenreaktionen als auch Probleme bei der Produktisolierung zu erwarten waren.¹²²

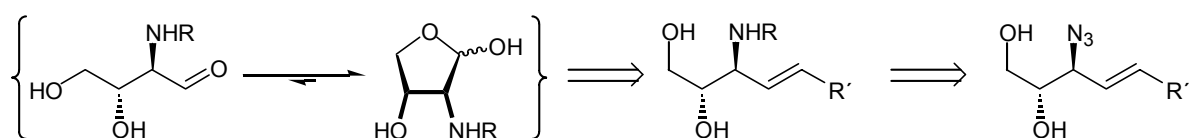


Abb. 41: Retrosynthese von *N*-funktionalisierten 2-Amino-2-desoxy-erythrose-Derivaten

Als olefinische Vorstufe kommen sowohl das styrylische als auch das vinyliche Derivat in Frage. Wegen der Indifferenz von Styrylaziden gegenüber Aza-Cope-Umlagerungen ([3,3]-sigmatrope Umlagerung), der praktikableren Aufarbeitung entsprechender

Ozonolyseprodukte sowie aus Gründen der leichteren Handhabbarkeit styrylischer Derivate im Vergleich zu den vinylischen Derivaten wurde die entsprechende styrylische Verbindung als Synthon bevorzugt.^{123,124}

Der hierfür benötigte Allylkohol **55** kann leicht über eine Knoevenagel-Kettenverlängerung in drei Stufen aus Zimtaldehyd und Malonsäure zugänglich gemacht werden.

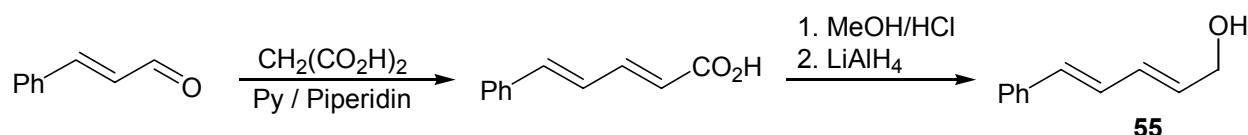


Abb. 42: Synthese des Allylkohols **55**

Vanadylacetylacetonat-katalysierte Monoepoxidierung des Allylkohols **55** liefert in Dichlormethan den empfindlichen Epoxyalkohol **56**, der nur in Form stabilisierter Derivate (z.B. als Acetat) isoliert werden kann. Wie Untersuchungen von O. Eyrisch im Arbeitskreis zeigten, bedarf es jedoch keiner Isolierung von **56**, vielmehr gelingt die *in situ*-Öffnung zum stabilen Azid **57** durch sukzessive Zugabe von *tert.*-Butylhydroperoxid und Tetramethylguanidiniumazid (TMGA), womit **57** in einer Eintopfreaktion in über 40% Gesamtausbeute erhältlich ist. Allerdings ist die Ansatzgröße wegen der chemischen Labilität des Epoxids **56** limitiert (< 5 mmol), da es sich bei fortschreitender Reaktionszeit durch Epoxidwanderung und Oligomerisierung der Azidöffnung entzieht.

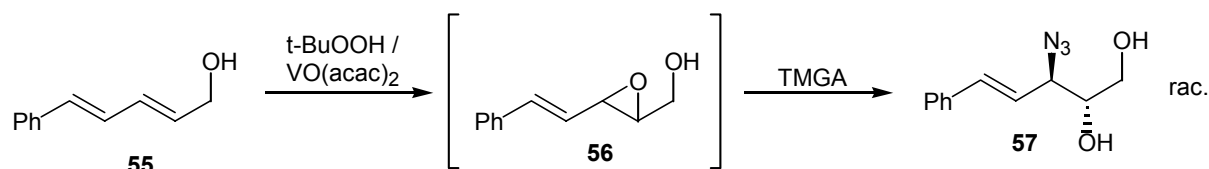


Abb. 43: Synthese des Azids **57** nach Eyrisch¹²²

Die Ozonolyse von **57** liefert die DL-2-Azido-2-desoxyerythrose **58** als Gleichgewichtsgemisch der beiden Furanose-Anomeren und des Aldehyd-Hydrats mit nur geringen Anteilen an freiem Aldehyd.^{122,125,126}

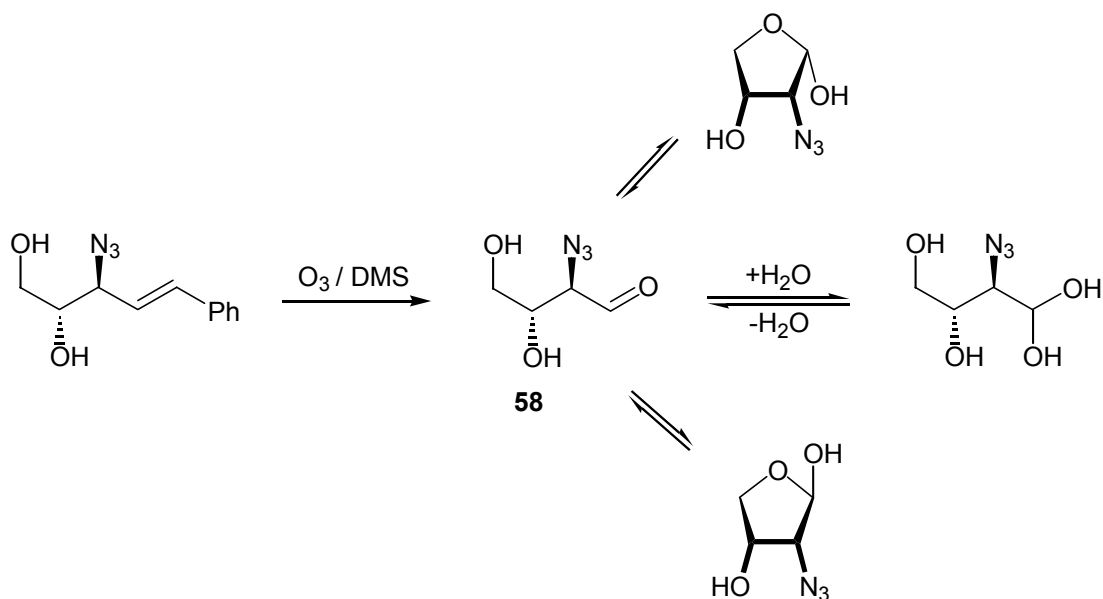


Abb. 44: Ozonolyse von **57** zu **58**

Eine chromatographische Aufreinigung des Ozonolyseproduktes ist zum einen deshalb nicht notwendig, da neben dem als Gleichgewichts-Gemisch der verschiedenen Formen erhaltenem Erythrosederivat keine Verunreinigungen detektierbar sind, und zum anderen präparativ auch nicht praktikabel, da eine Chromatographie des empfindlichen Produktes an Kieselgel mit Zersetzung einhergeht.

Die Azidfunktionalität konnte wie erwartet mit Triphenylphosphin glatt zum Amin **59** reduziert werden. Aus den oben aufgeführten Gründen wurde die Reduktion an der chemisch stabilen und kristallinen Verbindung **57** und nicht an dem Erythrosederivat **58** durchgeführt.

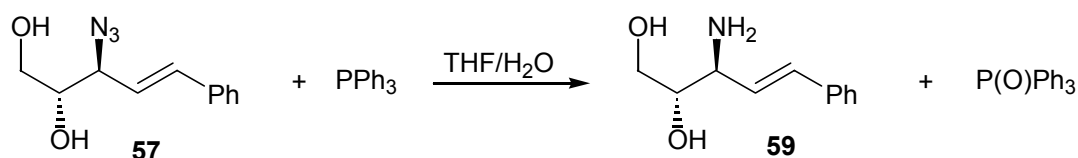


Abb. 45: Reduktion der Azid-Gruppe von **57**

Die Abtrennung des bei der Reduktion in äquimolaren Mengen gebildeten Triphenylphosphinoxids erwies sich allerdings als problematisch. So konnte das Amin **59**

weder chromatographisch, noch extraktiv – in Analogie zu Amin **29** – nebenproduktfrei isoliert werden. Versuche, die Reduktion mit polymergebundenem Triphenylphosphin durchzuführen, um nach beendeter Reaktion reines Produkt durch einfache Filtration zu isolieren, scheiterten.

Auf eine Abtrennung des gebildeten Phosphinoxids auf dieser Stufe wurde daher zunächst verzichtet und stattdessen das erhaltene Amin-Phosphinoxid-Gemisch direkt den folgenden Derivatisierungsreaktionen unterworfen.

Eine gezielte *N*-Acetylierung erwies sich hierbei als unerwartet schwierig, da neben der gewünschten Zielverbindung immer auch *O*-acetylierte Produkte sowie nicht umgesetztes Edukt erhalten wurden. Zwar gelang eine Separierung des Produktgemisches durch Chromatographie an Kieselgel, jedoch erwies sich eine direkte *N,O*-Peracetylierung mit anschließender selektiver Entschützung der *O*-Acetate als wesentlich effektiver.

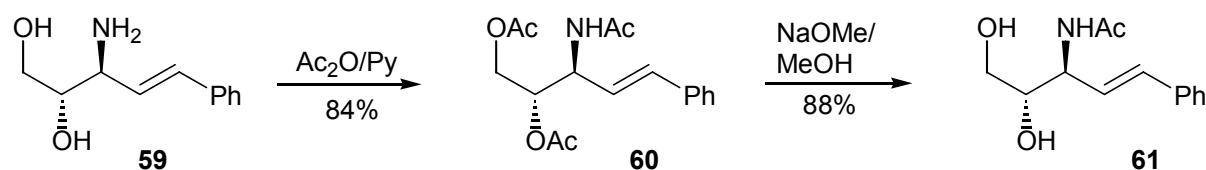


Abb. 46: Synthese des *N*-Acetyl-Derivats **61**

Das bei der Reduktion gebildete Triphenylphosphinoxid verursachte bei der Acetylierung keine Störung und konnte anschließend durch Chromatographie an Kieselgel leicht von **61** abgetrennt werden.

Weitere *N*-Derivatisierungen nach gängigen Literaturverfahren¹²⁷ sowohl mit Phenylessigsäurechlorid als auch mit Fmoc-Chlorid zu den entsprechend *N*-funktionalisierten Verbindungen verliefen problemlos und mit guten Ausbeuten, so daß **62** und **63** nach Chromatographie an Kieselgel in kristalliner Form erhalten werden konnten.

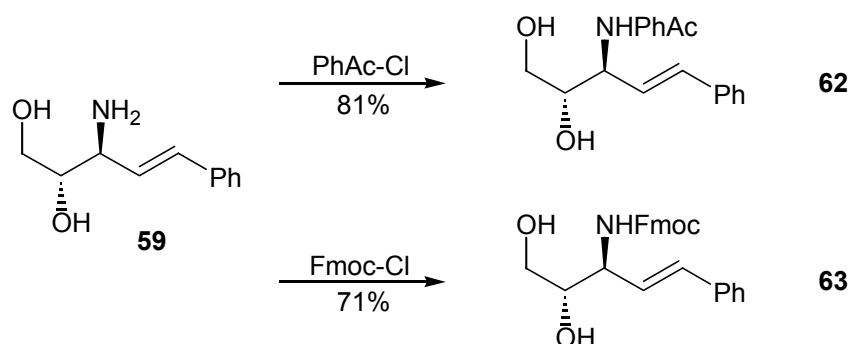


Abb. 47: Synthese von **62** und **63** nach gängigen Literaturverfahren¹²⁷

Durch Ozonolyse der Verbindungen **57** und **61-63** konnten die entsprechenden Erythrosederivate **58** und **64-66** komplikationsfrei generiert werden und ohne chromatographische Aufreinigung direkt als Gemisch der verschiedenen Formen in die Indium-vermittelte Allylierung eingesetzt werden.

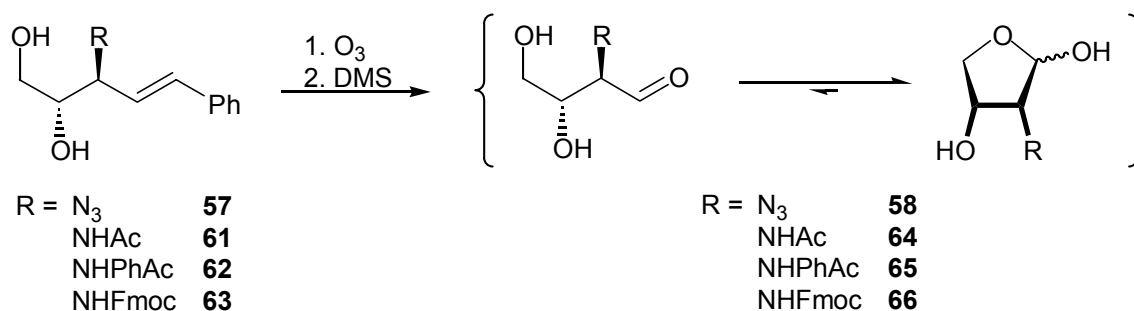


Abb. 48: Synthese der Erythrose-Derivate **58**, **64-66**

In Analogie zu der Indium-vermittelten Allylierung entsprechender Glycerinaldehyd-Derivate erfolgte die Addition wieder in acidem Milieu. Die so erhaltenen empfindlichen α -Methylen-ester wurden gereinigt und direkt ozonisiert, um mögliche Ausbeuteverluste durch z.B. Oligomerisierung zu vermeiden.

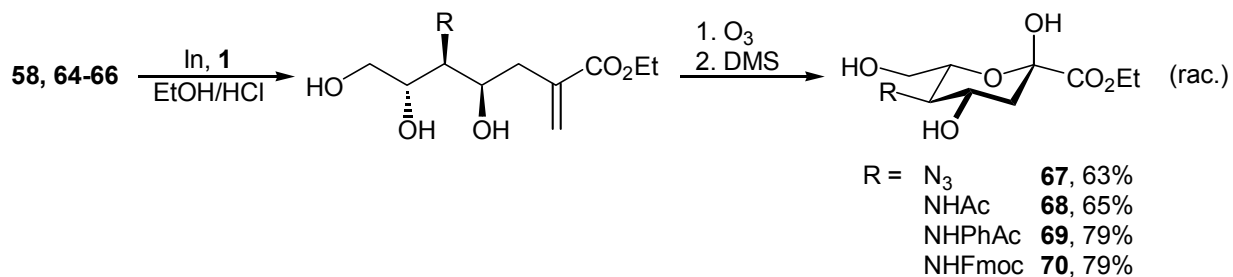


Abb. 49: Synthese der C7-Sialinsäureester **67-70**

Die mittels dieser Reaktionssequenz erhaltenen chemisch stabilen α -Ketoester (**67-70**) konnten durch Chromatographie an Kieselgel in hoher Reinheit und in guten Ausbeuten isoliert werden. Die Hydrolyse der Estergruppierung erfolgte unter den für C6-Sialinsäuren bewährten Bedingungen unter Freisetzung der C7-Sialinsäure-Derivate **71-74** (rac.) als Alkali-Salze.

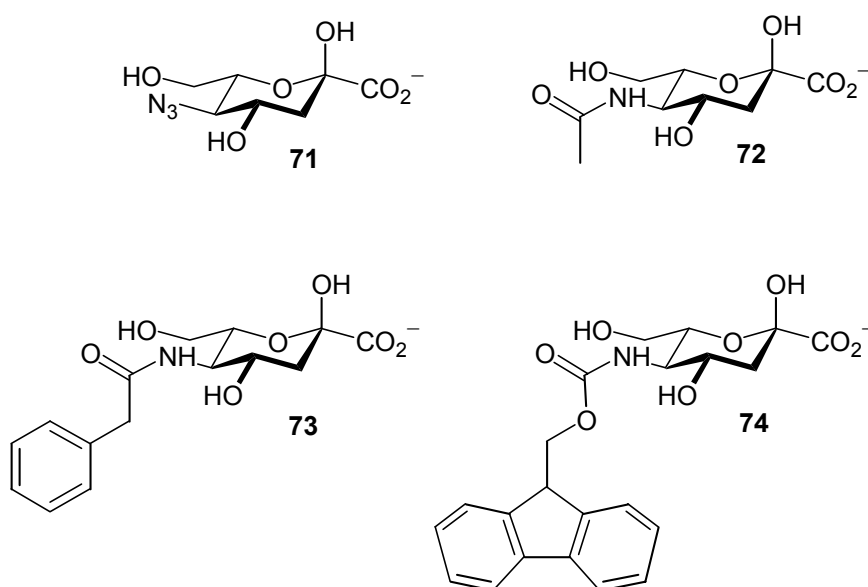


Abb. 50: C7-Sialinsäuren **71-74**

3. Ausgewählte Sialinsäurestrukturen

3.1. Einleitung

Die Indium-vermittelte Allylierung geeigneter aldehydischer Vorstufen mit Ethyl- α -(bromomethyl)acrylat eröffnet – wie oben beschrieben – den Zugang zu einer “Bibliothek“ von Sialinsäurederivaten, die als mögliche Substrate der CMP-Sialat-Synthetase für die enzymatische Synthese von Sialokonjugaten genutzt werden könnten.

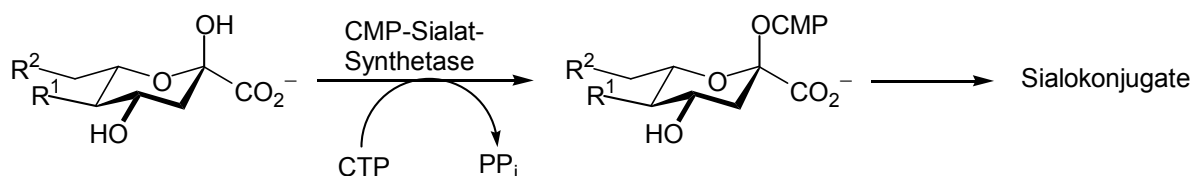


Abb. 51: Enzymatische Synthese von Sialokonjugaten

Die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Methoden erlauben eine breite Modifikation des Restes R^1 ($\text{R}^1 = \text{OH}, \text{N}_3, \text{NHR}'$), während die Seitenkette R^2 nur geringe Variation andersartiger Funktionalitäten zulässt. Aus diesem Grunde wurde nach Möglichkeiten gesucht, orthogonal derivatisierbare Funktionalitäten in die Seitenkette R^2 einzuführen.

3.2. Aldehyd-funktionalisierte Sialinsäuren

Im Hinblick auf das enorme chemische Potential von Aldehydgruppen war es reizvoll nach Möglichkeiten zu suchen um solche, Sialinsäurestrukturen aufzubauen, die diese Funktionalität in der Seitenkette tragen. Ausgehend von solchen Strukturen wären zahlreiche hoch selektive chemische, aber auch enzymatische Folgereaktionen denkbar, die einen breiten Zugang zu neuen Sialinsäure-Derivaten ermöglichen könnten.

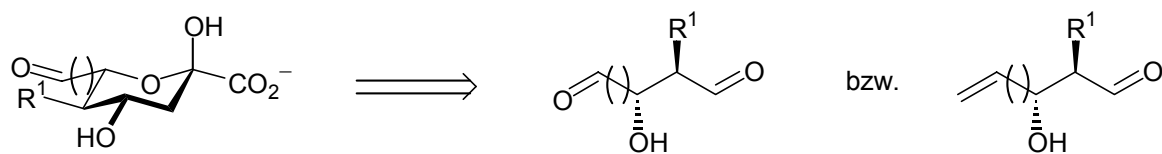


Abb. 52: Retrosynthese für Aldehyd-funktionalisierte Sialinsäuren

Ausgehend von 1,4-Dialdehyd-Derivaten bzw. den analogen ungesättigten Monoaldehyden ist die Synthese von Sialinsäure-Derivaten denkbar, die endständig Aldehyd-funktionalisiert sind. Die Synthese ungesättigter Monoaldehyd-Derivate wäre formal über eine Oxidations-Vinylierungs-Sequenz ausgehend von entsprechenden Glycerinaldehyd-Derivaten vorstellbar.

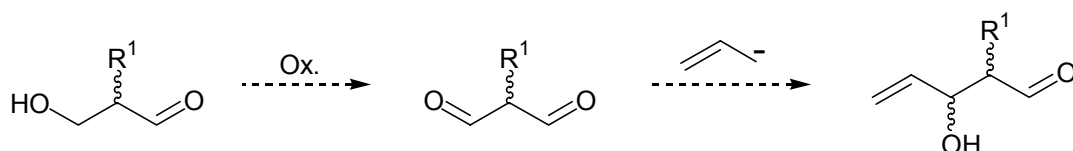


Abb. 53: Syntheseplan für ungesättigte Aldehyd-Derivate

Die Oxidation geeigneter Glycerinaldehyd-Derivate ging jedoch mit Oligo- bzw. Polymerisationsreaktionen einher, die auch durch vorangehende Acetalisierung der freien Aldehydfunktion nicht unterdrückt werden konnten.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde nach alternativen Möglichkeiten gesucht, Dialdehyde so zu generieren, daß sie direkt in die Allylierung eingesetzt werden können. Prinzipiell können Dialdehyde ozonolytisch aus den entsprechenden linearen (endständigen) Dienen, aber auch aus passenden cyclischen Monoalkenen synthetisiert werden, wobei der Einsatz Letzterer zu bevorzugen ist, da hierbei die Ozonolyse nebenproduktfrei ablaufen sollte.

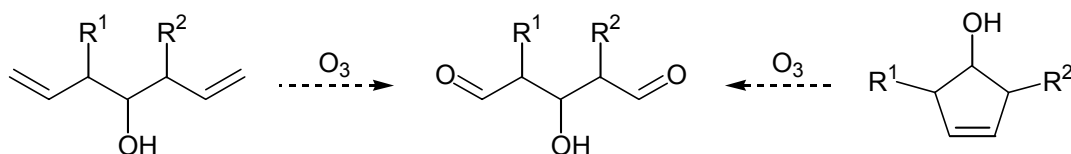


Abb. 54: Dialdehyde aus olefinischen Vorstufen

Bei der Indium-vermittelten Allylierung von Dialdehyden stehen prinzipiell beide Aldehydfunktionen für einen nucleophilen Angriff zur Verfügung. Die Bildung des unerwünschten Diallylierungsproduktes sollte durch den stöchiometrischen Einsatz von (max.) einem Äquivalent Allylierungsreagenz minimiert werden können. Ein weiteres Problem tritt bei der Allylierung dann auf, wenn die beiden noch nicht näher definierten Reste R^1 und R^2 nicht identisch sind, also nicht die entsprechende *meso*-Verbindung eingesetzt wird; dann ist nämlich die Bildung von zwei, chemisch nicht äquivalenten Monoallylierungsprodukten zu erwarten, die jeweils wiederum die Möglichkeit zur Cyclisierung besitzen und somit ein vergleichsweise komplexes Reaktionsgemisch verursachen würden.

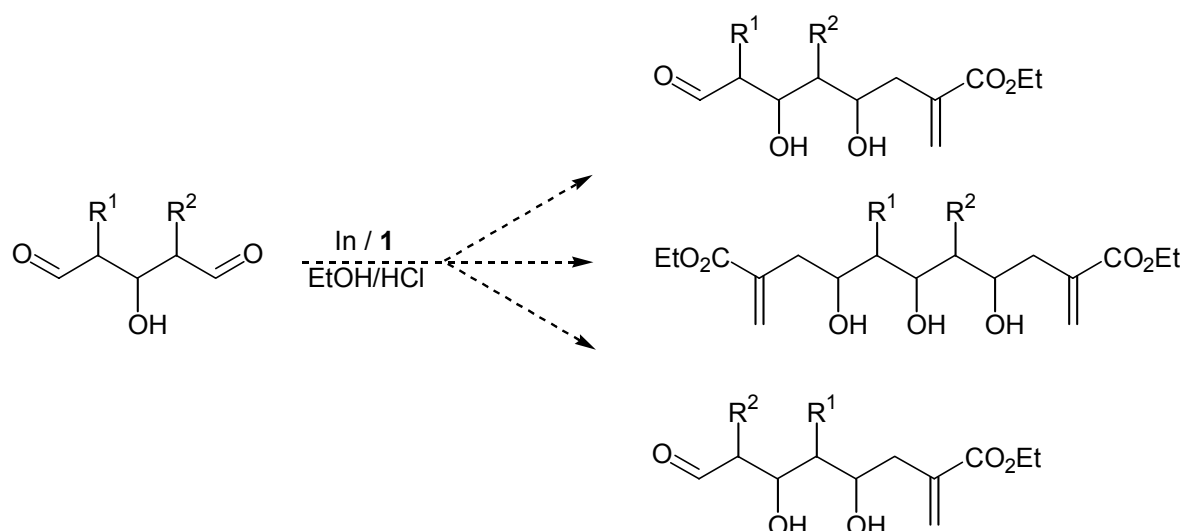


Abb. 55: Mögliche Produktvielfalt bei der Allylierung von Dialdehyden ($R^1 \neq R^2$)

Ein sinnvoller Einstieg in diese Thematik erfolgte daher zunächst durch den Einsatz von 3-Hydroxycyclopenten **75** als Dialdehydvorstufe.^{128,129}

Letzteres konnte ausgehend von Cyclopentadien mittels kontrollierter Hydroborierung in ausreichenden Mengen synthetisiert und daraus anschließend der gewünschte Dialdehyd **76** durch Ozonolyse nebenproduktfrei generiert werden.

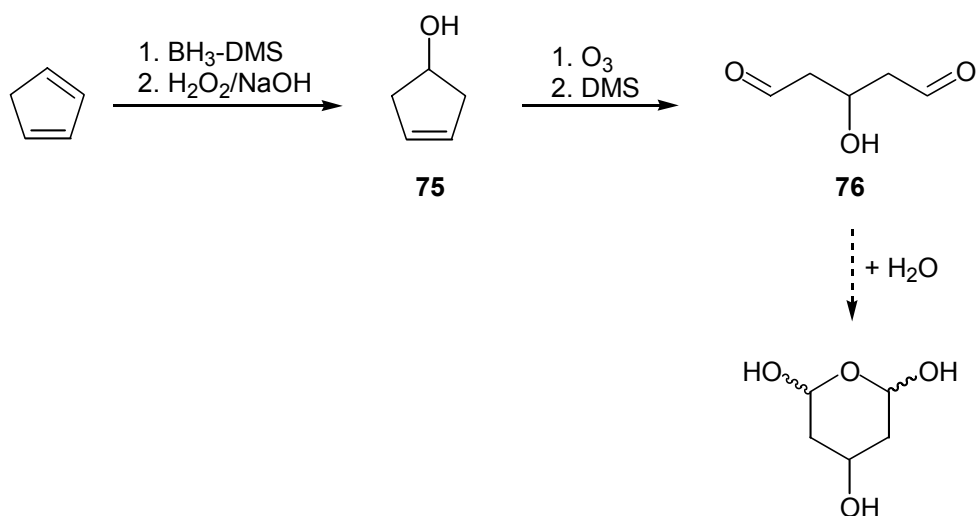


Abb. 56: Synthese von **76** aus Cyclopentadien

Die Indium-vermittelte Allylierung des Dialdehyds **76** erfolgte unter den bewährten aciden Bedingungen, jedoch unter Einsatz von lediglich einem Äquivalent Acrylsäureester **1**, um die Bildung des zweifach allylierten Produktes zu unterdrücken.

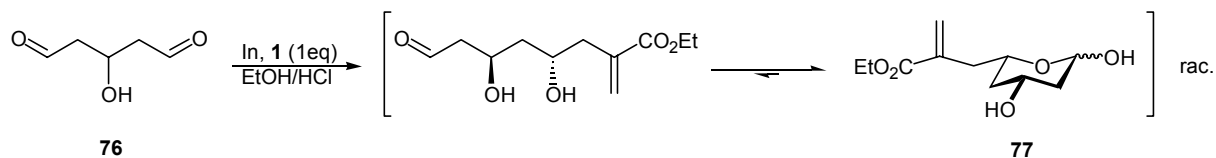


Abb. 57: Indium-vermittelte Allylierung von **76**

Das monoallylierte Produkt **77** konnte auf diesem Weg hoch diastereoselektiv in 32% Ausbeute als α/β -Anomerengemisch (unter NMR-Bedingungen: 1/1) der racemischen Pyranoseform isoliert werden. Durch Ozonolyse von **77** sollte nun die Synthese eines Ketose-Aldose-Gemisches möglich sein.

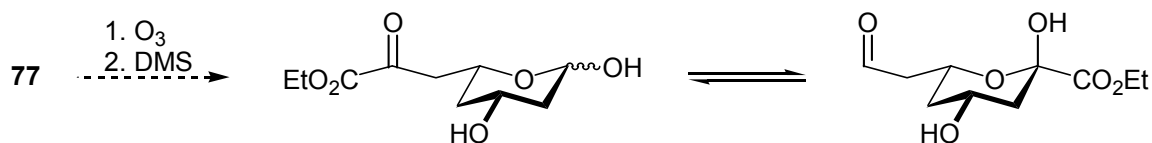


Abb. 58: Ozonolyse von **77**

Entsprechende Umsetzungen verliefen jedoch unter partieller Zersetzung und Ausbildung eines komplexen Reaktionsgemisches, das bisher weder Separierung noch Identifikation zu erwartender Komponenten zuließ.

Die Synthese endständig Aldehyd-funktionalisierter Sialinsäuren konnte somit auf diesem Wege nicht realisiert werden. Eine mögliche Ursache hierfür wäre evtl. in der Ausbildung der chemisch sensitiven Didesoxy-Strukturen zu suchen. Aus diesem Grund sollte zunächst die dem Dialdehyd **76** analoge 2,4-Didesoxypentose **78** verfügbar gemacht und zur Kettenverlängerung eingesetzt werden.

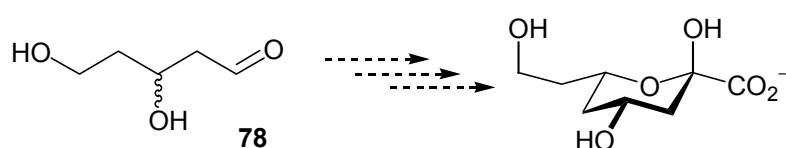


Abb. 59: geplanter Zugang zur 3,5,7-Tridesoxy-2-octulosonsäure

3,5-Dihydroxypentanal (bzw. DL-2,4-Didesoxypentose) **78** ist nicht kommerziell erhältlich. Ausgehend von dem kommerziell verfügbaren 3-Buten-1-ol konnte **78** aber in einer Ozonolyse-Allylierung-Ozonolyse-Sequenz rasch und in guter Gesamtausbeute (78%) erhalten und als α/β -Anomerengemisch (unter NMR-Bedingungen $\sim 1/1$) der racemischen Furanose charakterisiert werden.

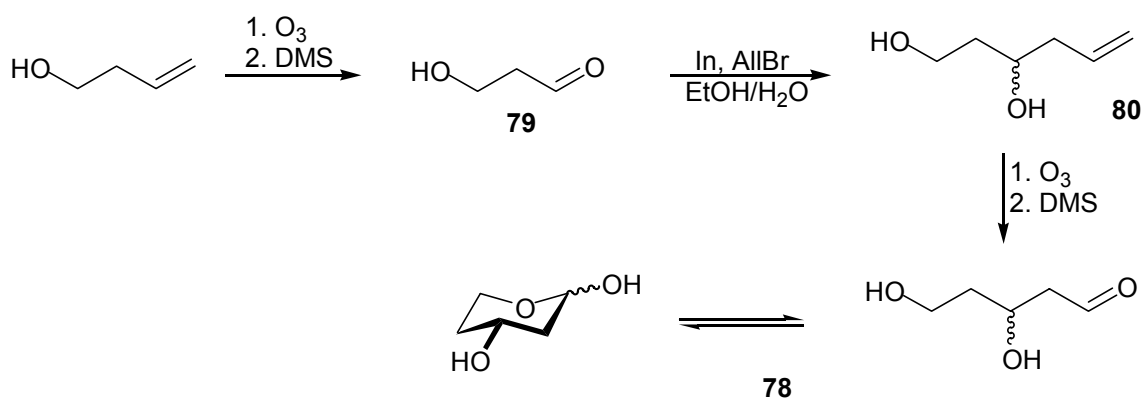


Abb. 60: Synthese von **78**

Die Indium-vermittelte Allylierung von **78** verlief unerwartet wenig diastereoselektiv und lieferte die diastereomeren, racemischen Ester **81** und **82** in einem Verhältnis von 3:2.

Anscheinend kommt es unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht (oder zumindest nur in geringem Umfang) zu der Ausbildung eines selektivitätsbestimmenden cyclischen Chelats zwischen dem eingesetzten Indium und dem Aldehydsauerstoff sowie der β -Hydroxyfunktion der Carbonylverbindung und somit auch nicht zu einem sterisch bevorzugten Angriff des Acrylats unter Ausbildung des eigentlich zu erwartenden *anti*-Produktes.

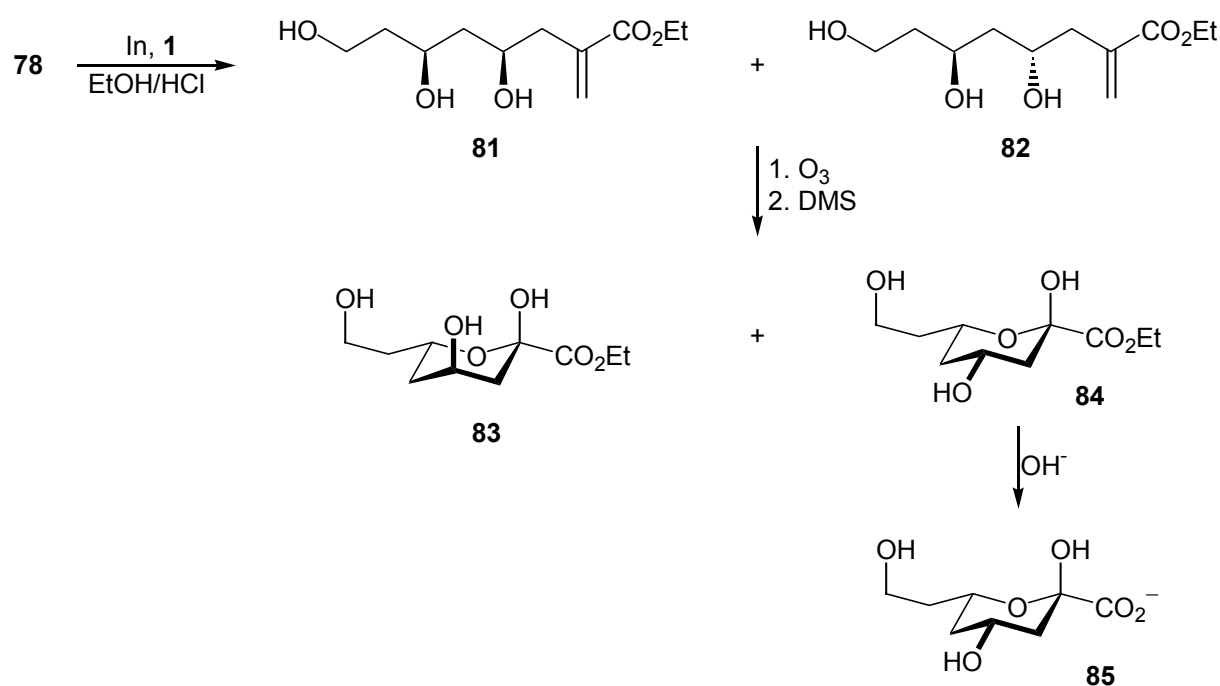


Abb. 61: Indium-vermittelte Allylierung von **78**

Im Gegensatz zu der, bei der Ozonolyse von **77** beobachteten, partiellen Zersetzung verlief die Ozonolyse des offenkettigen Gemisches **81/82** glatt und unter Ausbildung der Ketoester **83** und **84**, welche durch Chromatographie an Kieselgel separiert werden konnten. Die gesuchte Sialinsäure **85** konnte anschließend durch basische Hydrolyse von **84** rein isoliert werden.

Die unter Zersetzung und Ausbildung eines heterogenen Reaktionsgemisches ablaufende Ozonolyse von **77** kann somit nicht (ausschließlich) durch die Bildung der chemisch empfindlichen Didesoxy-Struktur erklärt werden. Folglich muß vielmehr davon ausgegangen werden, daß wegen der Kombination einer sensitiven Aldehydgruppierung mit der elektrophilen Ketoestergruppe ein Zugang zu endständig Aldehyd-funktionalisierten Sialinsäure-Analoga auf diesem Wege kaum problemlos realisierbar sein wird.

3.3. Endständig *N*-funktionalisierte Sialinsäuren

Die Synthese endständig *N*-funktionalisierter Sialinsäuren stellt insofern ein reizvolles Ziel dar, als dadurch die Möglichkeit gegeben wäre, Strukturen zu generieren, die anders als entsprechend *O*-funktionalisierte Derivate eine chemo-selektive weitere Modifizierung sowohl auf der Stufe der freien Sialinsäure, als auch auf der Stufe von daraus abgeleiteten Sialokonjugaten realisierbar erscheinen lassen.

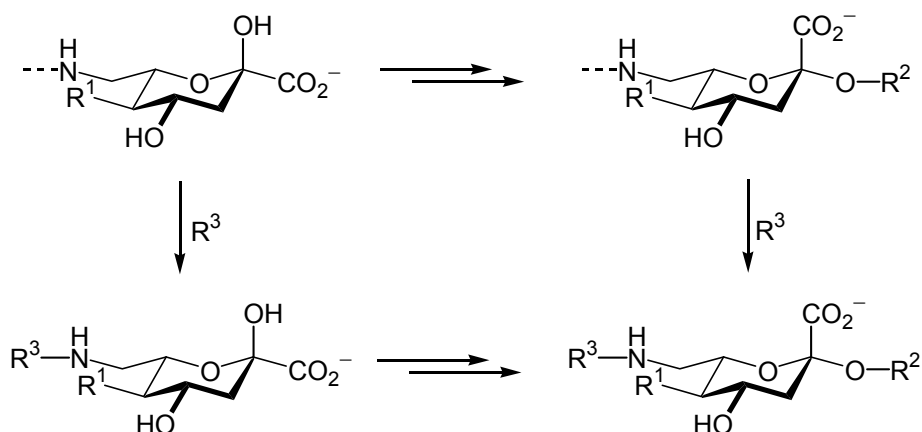


Abb. 62: Beispielhafte Strukturen terminal *N*-funktionalisierter Sialinsäuren bzw. deren glycosidische Konjugate

Als Vorstufe für die chemische Synthese solcher endständig *N*-funktionalisierter Sialinsäurederivate kamen insbesondere endständig *N*-funktionalisierte β -Hydroxyaldehyde in Betracht.

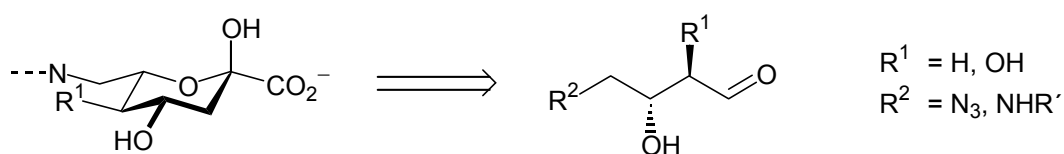


Abb. 63: Retrosynthese endständig *N*-funktionalisierter Sialinsäurederivate

Am Beispiel der C7-Sialinsäure **86** sollte beispielhaft geklärt werden, welcher synthetische Zugang zu der – kommerziell nicht verfügbaren – aldehydischen Vorstufe **87** vorteilhaft wäre.

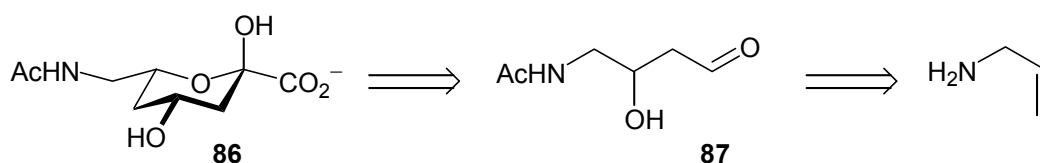


Abb. 64: Retrosynthese von **86**

Als plausible, kommerziell erhältliche Vorstufe für die Synthese von *N*-Acetyl-4-amino-3-hydroxy-butanal **87** bot sich Allylamin an.

Zunächst wurde hierfür die freie Aminfunktion unter Standardbedingungen mit Acetanhydrid acetyliert. Das erhaltene Amid **88** wurde ozonolytisch in den labilen Acetaldehyd **89** überführt,¹³⁰ welcher ohne weitere Aufreinigungsschritte direkt mit Allylbromid Indium-vermittelt in befriedigender Ausbeute zu dem entsprechenden Penten-Derivat **90** verlängert werden konnte.

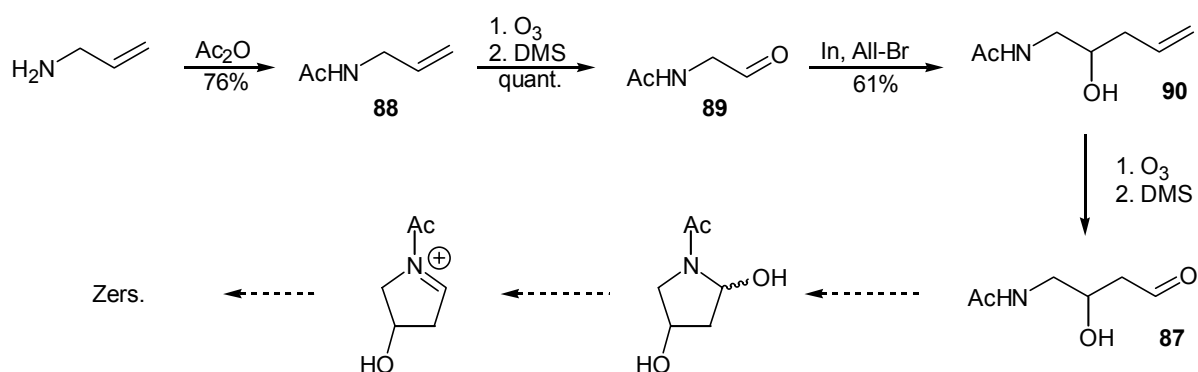


Abb. 65: Versuchte Synthese des Aldehyds **87**

Nach Ozonolyse des Penten-Derivats **90** konnte der gesuchte Aldehyd **87** jedoch nicht genutzt werden, vielmehr zeigte die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle innerhalb von wenigen Minuten seine vollständige Zersetzung an.

Wie schon in Abschnitt 2.1. für die Synthese von α -Aminoaldehyden generell erörtert, ist die Ozonolyse geeigneter olefinischer Vorstufen die mildeste und präparativ sicher die praktikabelste Methode zur Synthese von Aminoaldehyden. Die hier beobachtete spontane

Zersetzung des ozonolytisch generierten Aldehyds **87** zeigt daher deutlich auf, daß eine Synthese bestimmter Aminoaldehyde aufgrund ihrer chemisch hoch sensitiven Natur präparativ dennoch nicht immer problemlos realisierbar ist.

Die mögliche Synthese endständig *N*-funktionalisierter Sialinsäuren war jedoch nicht nur auf die Verwendung von γ -Amino- β -hydroxyaldehyde beschränkt, vielmehr waren auch länger-kettige endständig *N*-funktionalisierte β -Hydroxyaldehyde als Synthesevorstufen gleichermaßen attraktiv.

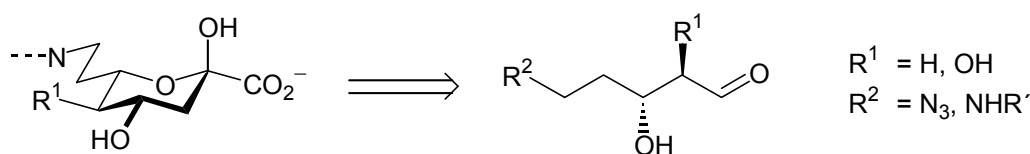


Abb. 66: Retrosynthese längerkettiger endständig *N*-funktionalisierter Sialinsäuren

Als weitgehend universelle Synthesebausteine für *N*-funktionalisierte Verbindungen bieten sich Azid-funktionalisierte Vorstufen an, die sich – wie am Beispiel der α -Aminoaldehyde demonstriert – äußerst leicht und variabel derivatisieren lassen.

Im Folgenden wurden daher Möglichkeiten erprobt, solche endständig Azid-substituierte β -Hydroxyaldehyde zu synthetisieren, um diese dann durch die bewährte Allylierungssequenz in die entsprechenden Sialinsäurederivate zu überführen.

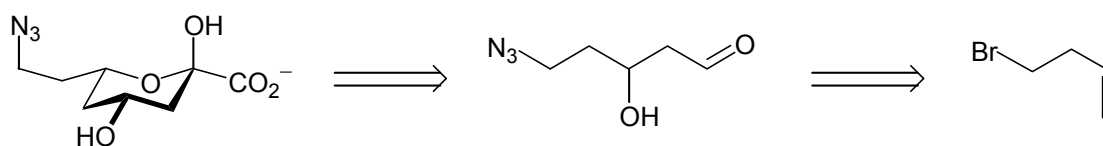


Abb. 67: Retrosynthese endständig Azid-funktionalisierter Sialinsäuren

Für die Synthese des C5-Aldehyds 5-Azido-3-hydroxypentanal kam 4-Brom-1-buten als Ausgangskomponente in Frage.

Im ersten Schritt wurde die Bromverbindung durch Substitution mit Natriumazid in das entsprechende Azid **91** überführt.¹³¹ Ozonolyse von **91** lieferte den chemisch instabilen Aldehyd **92** (3-Azidopropanal), der ohne weitere Aufreinigung zur Kettenverlängerung mit Allylbromid eingesetzt wurde. Ursache für die ungewöhnlich geringe Ausbeute der Indium-vermittelten Allylierung von nur 34% sind einerseits in der empfindlichen Natur des

eingesetzten Aldehyds zu suchen, der unter Abspaltung von Stickstoffwasserstoffsäure und Bildung von Acrolein (stechender Geruch) Ausbeuteverluste verursacht, andererseits sind aber auch Folgereaktionen des allylierten Produktes **93** nicht völlig auszuschließen. Alle Versuche mittels Ozonolyse von **93** den gewünschten Aldehyd **94** für eine Weiterverwendung zu erzeugen scheiterten, wobei in Analogie zu den entsprechenden Umsetzungen des Pentenderivats **90** dünnschichtchromatographisch innerhalb weniger Minuten nur die vollständige Zersetzung des Produkts beobachtet werden konnte.

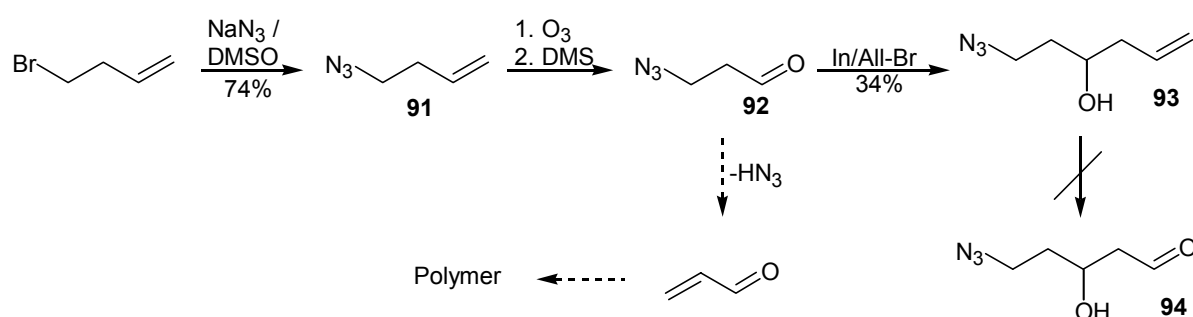


Abb. 68: Versuchte Synthese des Aldehyds **94**

Die Synthese von endständig *N*-funktionalisierten Sialinsäuren war somit präparativ durch Indium-vermittelte Allylierung entsprechender Aldehyde nicht ohne Weiteres zu realisieren. Die hierfür benötigten endständig *N*-funktionalisierten β -Hydroxyaldehyde erwiesen sich als chemisch kaum vernünftig handhabbar. Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle der Ozonolyseversuche entsprechender olefinischer Vorstufen (**90**, **93**) ließ zwar jeweils die Bildung der gewünschten Aldehyde (**87**, **94**) erkennen, deren Isolierung war aber nicht möglich, da innerhalb weniger Minuten komplette Zersetzung unter Ausbildung nicht näher definierter Produkte von vermutlich polymerer Natur beobachtet werden mußte.

3.4. *N*-Phenylacetylneuraminsäure

Die Synthese von C9-Sialinsäuren aus den entsprechenden Mannose-Derivaten kann sowohl enzymatisch als auch chemisch erfolgen. Bei der enzymatischen Synthese von Sialinsäure-Analoga stehen dem Biochemiker vornehmlich zwei Syntheserouten basierend auf dem Einsatz der Neu5Ac-Aldolase (NeuA)^{45,132-135} bzw. der Neu5Ac-Lyase (NeuS)¹³⁶⁻¹³⁸ offen.

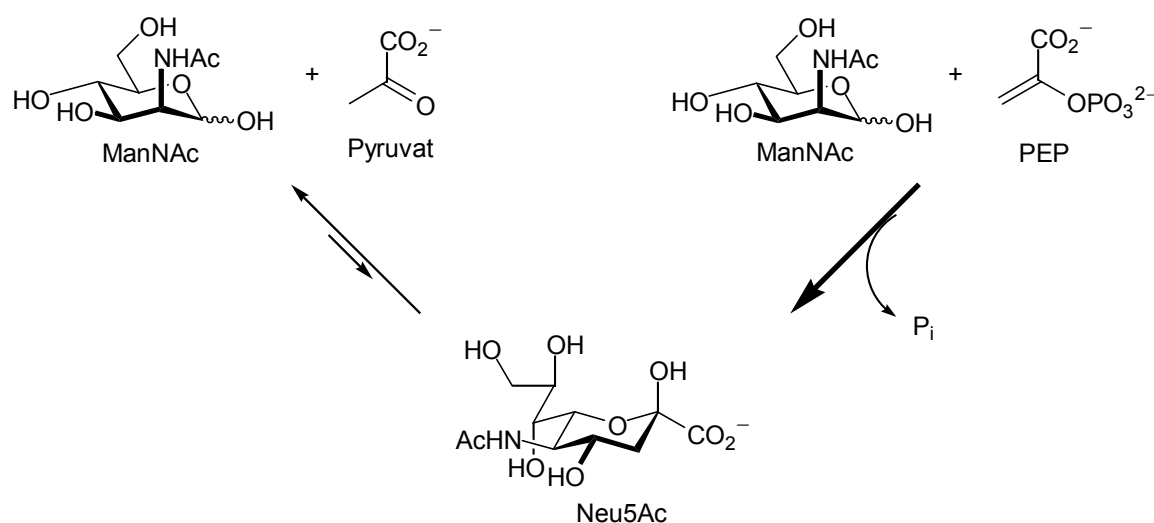


Abb. 69: Enzymatische Synthesen der *N*-Acetylneuraminsäure

Im Gegensatz zur nahezu ausschließlich genutzten Umsetzung von ManNAc und Pyruvat mit der kommerziell erhältlichen Aldolase (NeuA) liegt das Gleichgewicht bei der durch die Phosphoenolpyruvat (PEP)-abhängigen Lyase (NeuS) katalysierten Reaktion auf der Seite der Produkte. Wegen dieser im Vergleich zur einfachen Aldoladdition thermodynamisch und kinetisch begünstigten Reaktion ist man an der Gewinnung und Charakterisierung der Neu5Ac-Lyase hoch interessiert. An dieser Stelle sei auf entsprechende Arbeiten von Frau Dr. M. Knorst im Arbeitskreis hingewiesen, in denen die Neu5Ac-Lyase aus einem neu konstruierten, rekombinanten *E. coli*-Stamm gewonnen und erstmals für die Synthese von Neuraminsäure-Analoga genutzt werden konnte.⁵²

Komplementär zu diesen enzymatischen Verfahren gelingt die Synthese von Neuraminsäure-Analoga allerdings auch chemisch durch die Indium-vermittelte Allylierung entsprechender Mannosamin-Derivate (s.o.).

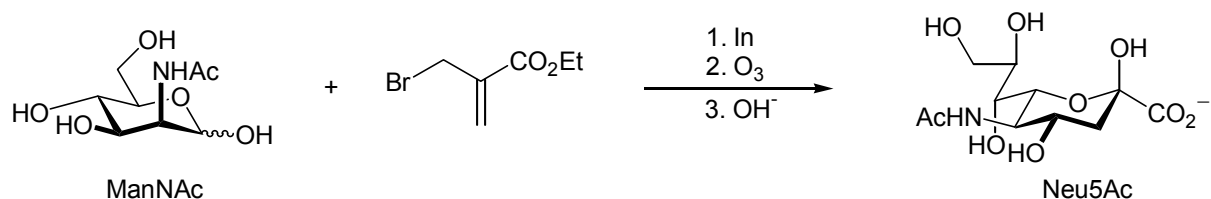


Abb. 70: Chemische Synthese der *N*-Acetylneuraminsäure

Unabhängig vom gewählten Syntheseweg erfolgt eine Derivatisierung am Stickstoff üblicherweise bereits auf der Stufe des eingesetzten Mannosamin-Derivats⁸⁶ und nicht an der fertigen Neuraminsäure, so daß zumindest bei der chemischen Route aufgrund der in der Reaktionssequenz unabdingbaren C=C-Spaltung keine ungesättigten Derivate synthetisierbar sind. Die nachträgliche chemische Einführung von Modifikationen am Stickstoff der Neuraminsäure verursacht insofern präparative Probleme, als daß unter den hierfür typischen Bedingungen (z.B. Entschützen der NHAc-Gruppe oder Reduktion der N₃-Gruppe) eine Cyclisierung über das freie Amin mit der 2-CO-Gruppe und damit zusammenhängende Folgereaktion zu erwarten sind, die auch durch vorangehende Acetylierung der freien Hydroxygruppen nicht effektiv zu unterdrücken sein werden.

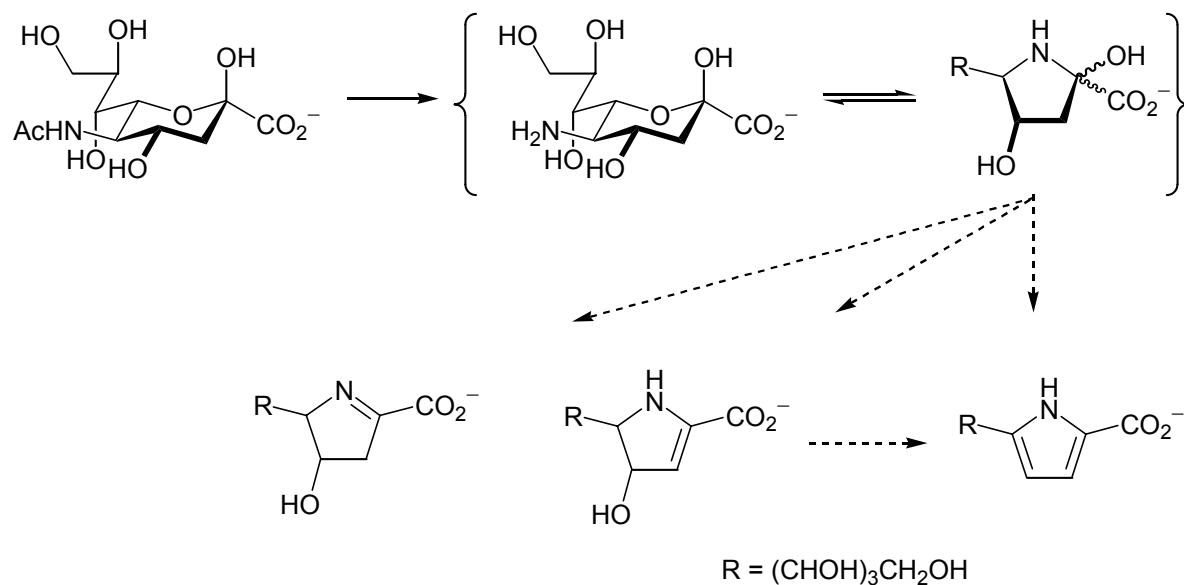


Abb. 71: Mögliche Folgereaktionen einer Deblockierung der Aminfunktion

Ein Ausweg aus diesem Dilemma wurde von *Whitesides et al.* auf der Basis des *tert*-Butoxycarbonyl-geschützten Neuraminsäureethylesters (Neu5Boc) publiziert, der Indium-vermittelt aus dem entsprechenden Mannosamin-Derivat synthetisiert werden konnte. Neu5Boc wurde hierzu mit Acetanhydrid *O*-peracetyliert und anschließend am so geschützten Ethylester die *N*-Boc-Schutzgruppe selektiv mit Trifluoressigsäure entfernt. Das dabei erhaltene TFA-Salz konnte abschließend in Ausbeuten von 36-60% *N*-acyliert werden. Für die Reaktionssequenz ergaben sich jedoch Gesamtausbeuten von lediglich 25-41% an Endprodukten, die zusätzlich für Enzymreaktionen deacetyliert und hydrolysiert werden müssten.⁸⁶

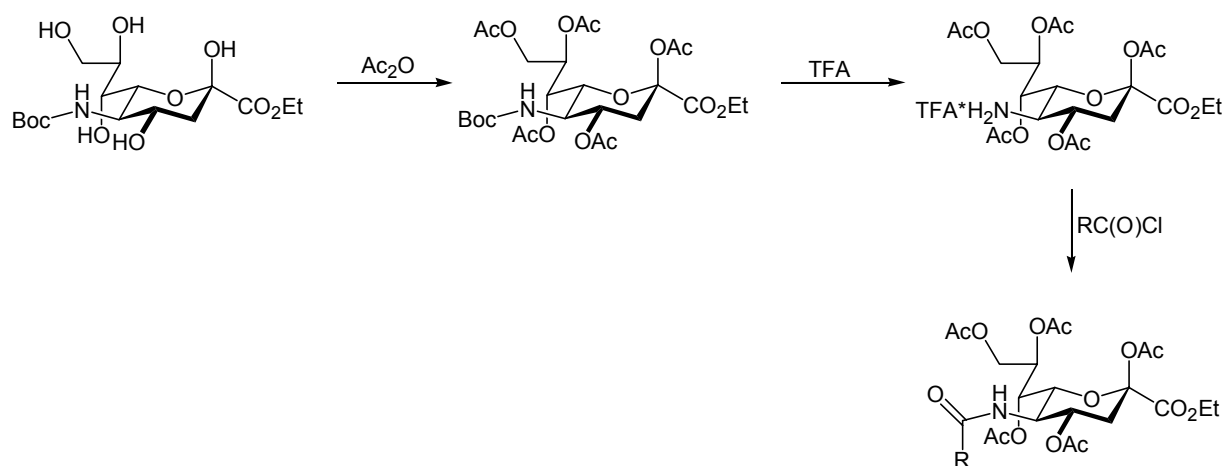


Abb. 72: Synthese von Neu5Ac-Derivaten nach *Whitesides et al.*⁸⁶

Eine andere, prinzipiell vom Ansatz her wesentlich attraktivere Alternative der *N*-Derivatisierung auf der Stufe der Sialinsäure (oder gar an fertigen Sialokonjugaten) wäre dann gegeben, wenn solche *N*-funktionalisierten Derivate eingesetzt werden könnten, bei denen das Entschützen der Aminfunktion enzymatisch unter besonders schonenden Bedingungen erfolgen kann.

Der Stand der Technik in der Produktion von β -Lactam-Antibiotica mit den Stammverbindungen der Penicilline und Cephalosporine liefert hierfür den gewünschten Ansatzpunkt.¹³⁹⁻¹⁴¹

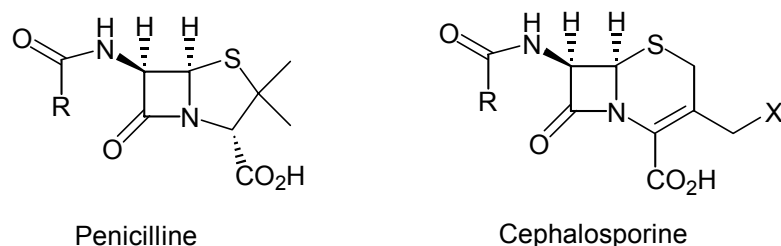


Abb. 73: Grundgerüst typischer β -Lactam-Antibiotica

Das mittels Fermentation durch Zufütterung von Phenyllessigsäure hergestellte Benzyl-Penicillin (Penicillin G) dient als Hauptausgangsstoff zur Synthese halb-synthetischer Penicilline, da die Seitenkette leicht durch die Penicillin-Acylase zur 6-Aminopenicillansäure gespalten wird und Letztere chemisch reacyliert werden kann.¹⁴²

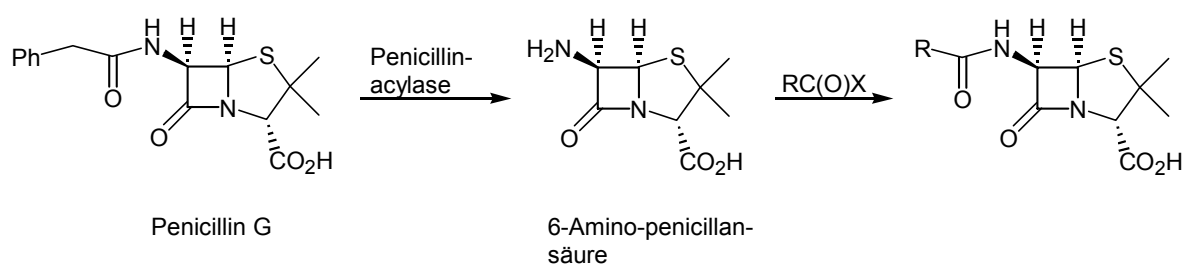


Abb. 74: Chemoenzymatische Synthese von Penicillin-Derivaten

Der präparative Nutzen solcher chemoenzymatischer Schutzgruppenmanipulationen wurde nicht nur im Bereich der β -Lactam-Antibiotica-Forschung erkannt, sondern findet auch schon seit einigen Jahren Anwendung bei der Peptidsynthese.^{143,144}

In Analogie dazu sind entsprechende Umacylierungen auch bei der Synthese von Sialokonjugaten denkbar.¹⁴⁵ Zu diesem Zweck sollte primär ausgehend von D-Mannosamin die entsprechende Sialinsäure (Neu5PhAc) zugänglich gemacht werden und im weiteren Verlauf zur Synthese von Sialokonjugaten eingesetzt werden.

D-Mannosaminhydrochlorid konnte hierfür in guten Ausbeuten mit Phenyllessigsäurechlorid in das entsprechende ManPhAc-Derivat **95** überführt und als α/β -Anomerengemisch (3:2) kristallin isoliert werden. Indium-vermittelte Allylierung von **95** mit Ethyl- α -(brommethyl)-

acrylat unter aciden Bedingungen lieferte hoch diastereoselektiv das entsprechende chemisch stabile Allylierungs-Addukt **96**, welches mittels Ozonolyse und Hydrolyse in die diastereomerenreine Sialinsäure **98** überführt werden konnte. Ausgehend von D-Mannosaminhydrochlorid gelang somit die Synthese von **98** in vier Stufen und mit einer Gesamtausbeute von 39%.

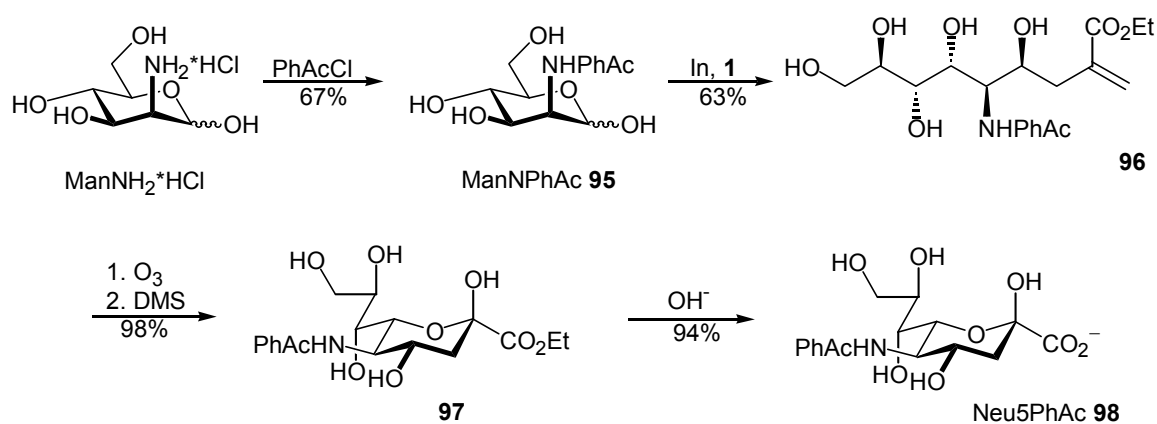


Abb. 75: Synthese von Neu5PhAc **98**

4. Enzymatischer Teil

4.1. Einleitung

Sialinsäuren stellen eine besonders wichtige Gruppe von Signalzuckern dar. Als die am häufigsten vorkommenden terminalen Komponenten von Oligosacchariden, Glycoproteinen und Glycolipiden sind sie in entscheidender Weise an vielfältigen biologischen Prozessen beteiligt.²⁷ Aufgrund ihrer exponierten Stellung auf der Zelloberfläche wird bei einer großen Anzahl von Viren (z.B. Influenzavirus, Polyomavirus, Reovirus) und Bakterien (z.B. *E. coli* K1, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus ducreyi*) die Bindung und Infektion des pathogenen Erregers über Sialinsäuren gesteuert.¹⁴⁶⁻¹⁵² Die *N*-Acetylneuraminsäure als die am häufigsten anzutreffende Sialinsäure wird *in vivo* aus der Vorstufe *N*-Acetylmannosamin synthetisiert. Neben diesem natürlichen Vorläufer konnten aber auch schon allothigen modifizierte *D*-Mannosaminderivate in eukaryotische Zellen inkorporiert und dem Biosyntheseweg des natürlichen Derivats folgend in *N*-substituierte Neuraminsäuren umgewandelt werden.¹⁵³ Durch die Möglichkeit, Zelloberflächen mittelbar mit derartigen Sialinsäurederivaten zu modulieren, eröffnen sich völlig neue Therapie-Ansätze in der Virologie und in all denjenigen Bereichen, in denen sialylierte Biomoleküle eine elementare Rolle spielen. Die Verstoffwechslung solcher am Stickstoff nicht unwesentlich (synthetisch) modifizierten Derivate verläuft interessanterweise ohne Anzeichen von Toxizität, noch konnte eine Verringerung der Zellproliferation beobachtet werden. Das impliziert, daß die Akzeptanz der am Sialinsäuremetabolismus beteiligten Enzyme gegenüber am Stickstoff modifizierten Derivaten sehr hoch ist. Neben der Carboxylfunktion scheint aber gerade jene C5-Position der Sialinsäuren eine Schlüsselrolle bei Sialinsäure-abhängigen Wechselwirkungen einzunehmen. So ist bekannt, daß das natürlich vorkommende, deaminierte Neuraminsäure-Derivat (KDN) im Gegensatz zu den aminierten Derivaten nicht von viralen und bakteriellen Sialidasen als Substrat erkannt wird.¹⁵⁴ Dies hat zur Folge, daß bei Infektionsprozessen, in denen die Enzym-katalysierte Hydrolyse der Sialinsäureeinheiten zu den Schlüsselschritten zählt, kein infektiöser Angriffspunkt vorhanden ist. Durch solche *in vivo*-Beobachtungen wird die ohnehin schon große Nachfrage nach modifizierten Sialinsäurestrukturen bzw. Sialokonjugaten noch zusätzlich verstärkt, um unter *in vitro*-Bedingungen den Einfluß

struktureller Veränderungen gezielt untersuchen zu können und somit mehr über die komplexen Struktur-Wirkungsbeziehungen von Sialinsäure-Konjugaten zu erfahren.

Der Zugang zu modifizierten Sialinsäurekonjugaten kann in drei elementare Syntheseschritte unterteilt werden. Primär müssen natürlich entsprechende Sialinsäurederivate verfügbar gemacht werden, die dann im zweiten Schritt aktiviert und in dieser aktivierten Form auf geeignete Sialyl-Akzeptorverbindungen übertragen werden können.

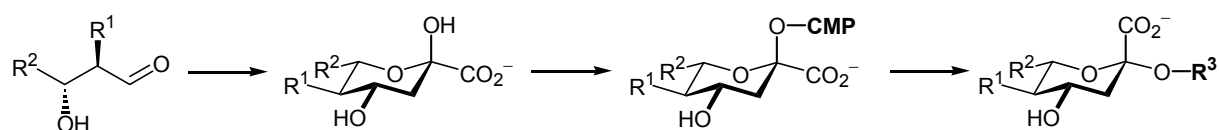


Abb. 76: Synthese von Sialokonjugaten

Wie in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich beschrieben gelingt die chemische Synthese von Sialinsäurederivaten durch Indium-vermittelte Allylierung geeigneter aldehydischer Vorläufer in hohen Ausbeuten und hoher Reinheit der Produkte. Dieser Syntheseweg erlaubt – bei Verfügbarkeit der aldehydischen Vorstufen – den Zugang sowohl zu natürlichen, aber auch zu nicht-natürlichen Sialinsäurederivaten und scheint (mit Ausnahme von Ozon-labilen Derivaten) praktisch unlimitiert. Neben dieser chemischen Methode können Sialinsäurestrukturen auch enzymatisch gewonnen werden, wobei mit der bisher hauptsächlich verwendeten Neu5Ac-Aldolase nach bereits optimierten Verfahren eine Reihe unterschiedlicher Derivate im präparativen Maßstab hergestellt werden konnten.¹⁵⁵⁻¹⁶¹

Wie Untersuchungen unter anderem von Frau Dr. Knorst im Arbeitskreis zeigten, kann auch die Neu5Ac-Lyase zur präparativen Synthese von Sialinsäurederivaten effektiv genutzt werden.⁵² Bislang ist jedoch eine enzymatische Synthese von C6- bzw. C7-Sialinsäuren (mit Ausnahme des C7-analogen KDN-Derivats **20**) nicht zu realisieren gewesen, da entsprechende C3 bzw. C4 Vorstufen von den zur Verfügung stehenden Enzymen nicht als Substrat akzeptiert werden, so daß solche Seitenketten-verkürzte Derivate nur chemisch erhältlich waren.

Die Anknüpfung der chemisch bzw. enzymatisch gewonnen Sialinsäuregruppierung an entsprechende Akzeptorsubstrate erfolgt unter Verwendung von Sialyltransferasen, die zum Teil kommerziell erhältlich sind. Sialyltransferasen übertragen Sialinsäurederivate α -selektiv in Abhängigkeit ihrer Akzeptorspezifität auf terminale Galactose-, *N*-Acetylgalactosamin-, *N*-Acetylglucosamin- und Sialinsäure-Einheiten. Strukturen, die eine oder mehrere dieser

terminalen Einheiten beinhalten, kommen somit als geeignete Sialyl-Akzeptorverbindungen in Frage. Eine Vielzahl verschiedener Sialyltransferasen sind in der Literatur beschrieben, die sich hinsichtlich ihres Ursprungs, ihrer Substratspezifität und der Position der von ihnen geknüpften Bindung unterscheiden.¹⁶²⁻¹⁶⁸ Neben den für Oligosaccharidsynthesen bisher vorzugsweise eingesetzten α -2,6- und α -2,3-Sialyltransferasen¹⁶⁹⁻¹⁷¹ sind auch schon verschiedene α -2,8- und α -2,9-Sialyltransferasen isoliert und kloniert worden.¹⁷² Unabhängig von der Art und Spezifität der Sialyltransferase bedarf es jedoch vorab einer Aktivierung des Sialinsäurederivats, da nur CMP-aktivierte Derivate für einen enzymatischen Sialyltransfer in Frage kommen. Diese, prinzipiell sowohl chemisch als auch enzymatisch erreichbare, essentielle CMP-Aktivierung bereitet jedoch noch Probleme.

Chemisch können CMP-Sialinsäure-Analoga über eine Phosphoramidit-Kopplung generiert werden, wie einige Publikationen der letzten Jahre zeigten. Jedoch gelingt diese Aktivierung nur mit Hilfe aufwendiger und kostspieliger Schutzgruppenmanipulation in einer vielstufigen Synthese; so bedarf es primär 2 Stufen für das Verestern und Schützen der freien Sialinsäure, 4 Stufen für die Bereitstellung des Phosphoramiditis aus CMP sowie weiterer 5 Stufen für die eigentliche Kopplung und die Freisetzung des CMP-Konjugats.

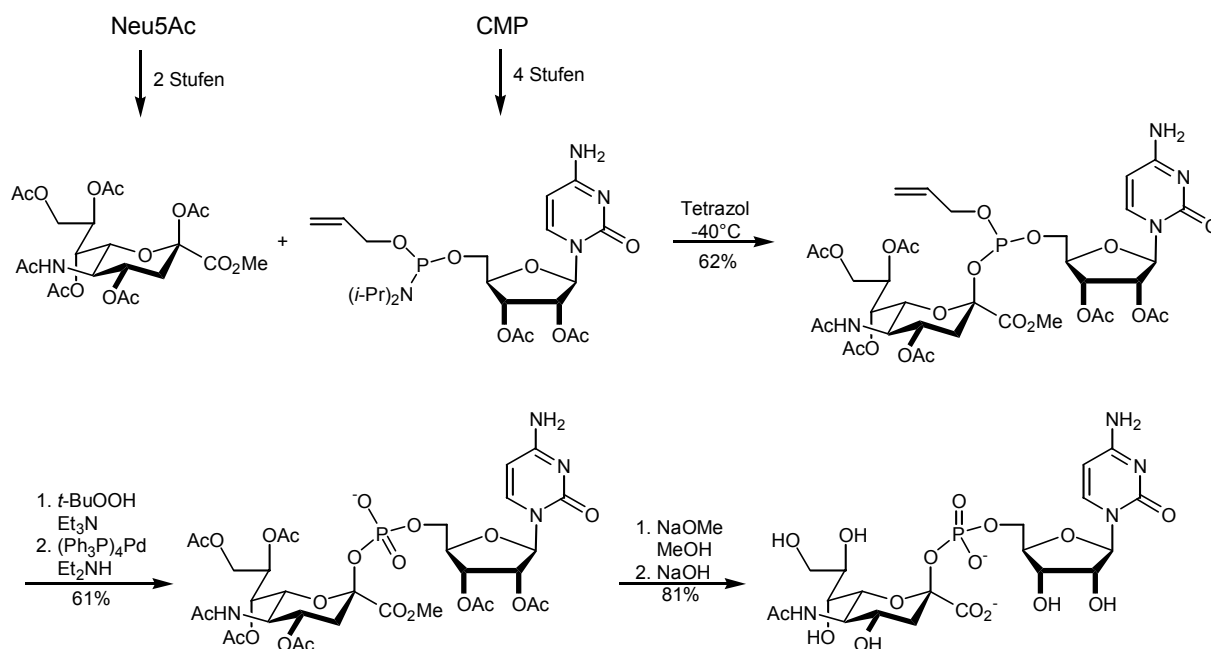


Abb. 77: Chemische Synthese von CMP-Neu5Ac

Auf diesem chemischen Syntheseweg konnten neben CMP-Neu5Ac auch die CMP-Konjugate der in C5-Position modifizierten Sialinsäuren KDN, Neu5Cbz und Neu5Gc mit teilweise befriedigenden Ausbeuten erhalten werden.¹⁷³⁻¹⁷⁶

Komplementär zu den aufwendigen chemischen Verfahren bietet sich eine enzymatische Aktivierung von Sialinsäuren an, die hoch effektiv und relativ einfach zu handhaben ist und sich, wie das Beispiel des natürlichen Substrats *N*-Acetylneuraminsäure zeigt, optimal mit dem anschließenden Sialyltransfer koppeln läßt.

Die enzymatische Aktivierung von Sialinsäuren wird von den CMP-Sialat-Synthetasen (EC 2.7.7.43) unter Verbrauch von CTP katalysiert.^{53,177}

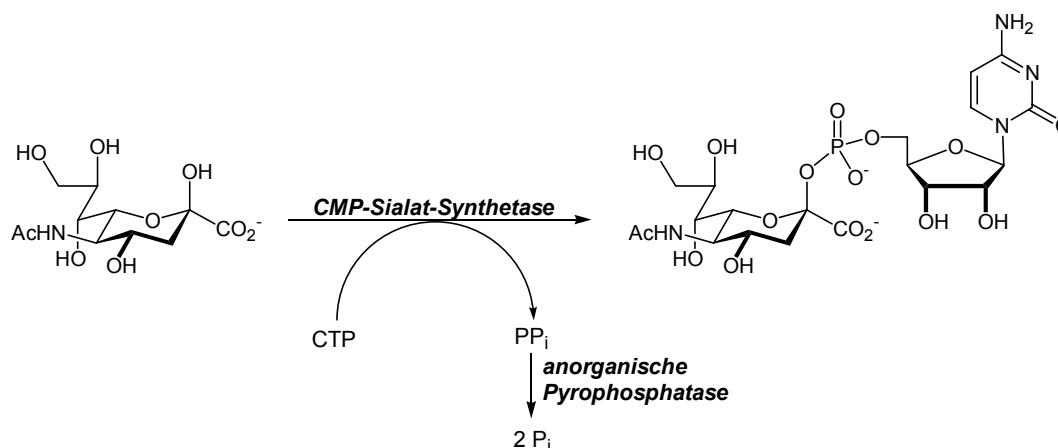


Abb. 78: Enzymatische Synthese von CMP-Neu5Ac

Die ersten hierzu verwendeten Enzyme wurden aus tierischem Gewebe gewonnen, in dem allerdings die Synthetase in der Regel nur in einer sehr geringen Konzentration enthalten ist. Dies hatte zur Folge, daß kaum größere Mengen an Enzym von konstanter Qualität erhalten werden konnten. Zusätzlich zu einer unbefriedigenden Stabilität ist auch die spezifische Aktivität gereinigter tierischer Synthetasen mit ca. 0.2 U/mg sehr gering, was sich für präparative Synthesen recht nachteilig auswirkt.¹⁷⁸⁻¹⁸¹

Tabelle 2: Vorkommen tierischer CMP-Sialat-Synthetasen

Enzymquelle	Aktivität des Homogenisats [U/mg]	Aktivität im Gewebe [U/mg]	Literatur
Kalbshirn	-	0.032	178
Unterkieferspeicheldrüse vom Kalb	-	0.027	179
Unterkieferspeicheldrüse von Schwein	-	0.006	179
Froschleber	0.036	0.09	180
Unterkieferspeicheldrüse vom Pferd	0.006	0.37	180
Testis von Regenbogenforellen	0.095	11.25	181

Neben tierischen Quellen können die Synthetasen auch aus Mikroorganismen gewonnen werden.¹⁸²⁻¹⁹¹ Erstmalig gelang die Isolierung einer CMP-Sialat-Synthetase aus *Neisseria meningitidis* der Serogruppe C,¹⁸² wobei allerdings nur sehr geringe spezifische Aktivitäten der Synthetase im Zellextrakt erhalten wurden und zudem dieses Bakterium wegen des hohen pathogenen Risikos als Enzymproduzent ungeeignet ist. Die Klonierung und Expression einer Synthetase aus *Neisseria meningitidis* Serogruppe Y in *E. coli* lieferte ein rekombinantes Enzym mit vergleichsweise hohen Aktivitätswerten.¹⁸⁴ Das Substratspektrum dieser Synthetase macht jedoch deutlich, daß nur geringe Modifikationen an den umzusetzenden Sialinsäuren erlaubt sind, damit sie von dem Enzym noch als Substrat erkannt und akzeptiert werden. So gelang neben der Umsetzung der natürlichen Substrats bisher nur eine Aktivierung der am 5-NH modifizierten Sialinsäuren Neu5Prop und Neu5Gc.¹⁸⁵ Die aus dem pathogenen Mikroorganismus *E. coli* K-235 (ATCC 13027; Serogruppe K1 O7) erhaltene CMP-Sialat-Synthetase ist bislang das einzige für Syntheseanwendungen intensiv untersuchte und kommerziell erhältliche Enzym.⁴⁷ Diese in einem nicht-pathogenen *E. coli*-Stamm produzierte Synthetase zeigt allerdings neben relativ niedrigen Expressionsraten und einer geringen spezifischen Aktivität (2-3 U/mg) ein sehr enges Substratspektrum, so daß nur wenige, an C9-modifizierte Sialinsäurestrukturen als Substrate akzeptiert werden.

Neben diesen in der Literatur beschriebenen CMP-Sialat-Synthetasen konnte von Frau Dr. Knorst im Arbeitskreis eine rekombinante Synthetase aus *Neisseria meningitidis* Serogruppe B mit Hilfe eines hoch effektiven Überexpressionssystems in *E. coli* erfolgreich produziert

werden, die eine Reihe von an C5-modifizierten Sialinsäurestrukturen als Substrate akzeptiert.⁵²

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte nun die Substratspezifität dieser neuen, rekombinanten CMP-Sialat-Synthetase näher untersucht werden. Zu diesem Zwecke sollten ausgehend von dem neuen rekombinanten *E. coli*-Stamm JM105/pKKNeuAc_3 ausreichende Mengen an Enzym produziert, gereinigt und auf ihre Akzeptanz gegenüber unkonventionellen Sialinsäurestrukturen getestet werden.

4.2. Präparation der CMP-Sialat-Synthetase

Um eine qualitative und quantitative Bewertung der Enzym-Produktion und der Aufreinigungsschritte durchführen zu können, bedarf es geeigneter Methoden zur Bestimmung der Gesamtaktivität sowie des Gesamtproteingehalts, womit die spezifische Aktivität bestimmt werden kann.

4.2.1. Aktivitätsbestimmung

Im Falle der CMP-Sialat-Synthetase stehen zwei Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität zur Verfügung: zum einen der Thiobarbitursäure-(TBA)-Assay^{192,193} und zum anderen der Phosphat-Assay nach *Lanzetta*.¹⁹⁴

Thiobarbitursäure-(TBA)-Assay

Der Thiobarbitursäure-Assay wurde ursprünglich für die Bestimmung von 2-Desoxy-D-ribose entwickelt, ist aber auch – geringfügig modifiziert – zum Nachweis von Neu5Ac geeignet. Bei der Behandlung von 2-Desoxy-D-ribose mit Periodat entsteht Malonaldehyd, der mit Thiobarbitursäure einen intensiv roten Farbstoff bildet, dessen Konzentration sich photometrisch mit Hilfe einer zuvor erstellten Eichgerade bestimmen läßt. Für die Bestimmung von 2-Keto-3-desoxy-aldonsäuren (z.B. Neu5Ac) müssen die Assaybedingungen leicht variiert werden, da unter Standardbedingungen nur eine schwache Farbstoffentwicklung zu beobachten ist. Durch Zugabe starker Säure gelingt jedoch auch eine quantitative Bestimmung der *N*-Acetylneuraminsäure. Die nach Amidhydrolyse, Periodatspaltung und

Reduktion des überschüssigen Periodats mit Arsenit entstehende β -Formylbrenztraubensäure (2,4-Dioxobutansäure) kuppelt mit Thiobarbitursäure zu einem intensiv roten Farbstoff. Die Extinktion und Selektivität können durch Extraktion des Farbstoffs mit Cyclohexan gesteigert werden, so daß der Neu5Ac-Gehalt aus der photometrischen Bestimmung der organischen Phase unter Zuhilfenahme einer Eichgerade empfindlich und zuverlässig erhalten wird.¹⁹² Wie jüngste Veröffentlichungen zeigen, ist mit dieser Methode in Kombination mit HPLC-Trenntechniken eine Nachweisgrenze bis zu 2 pmol zu erreichen.¹⁹³

Phosphat-Assay nach *Lanzetta*¹⁹⁴

Bei der enzymatisch katalysierten Umsetzung von Sialinsäuren mit CTP wird neben der entsprechenden CMP-Sialinsäure ein Äquivalent anorganisches Pyrophosphat gebildet, das durch Zugabe einer anorganischen Pyrophosphatase zu zwei Äquivalenten Phosphat hydrolysiert werden kann. Der Gehalt an Phosphat läßt sich hochempfindlich nach einer Methode von *Lanzetta* durch den Einsatz von Malachitgrün unter Ausbildung eines intensiv grünen Farbkomplexes photometrisch bei einer Wellenlänge von 646 nm bestimmen.¹⁹⁴ Um sicherzustellen, daß der gemessene Phosphatgehalt ausschließlich durch die Synthetase-katalysierte Reaktion und nicht durch unspezifische (enzymatische) Hydrolyse von CTP hervorgerufen wird, werden Blindproben vermessen, bei denen entweder die Neuraminsäure oder aber die Enzymlösung durch ein entsprechendes Puffervolumen ersetzt werden. Die Vermessung von Standardproben mit definiertem Phosphatgehalt zeigte, daß die Absorption mindestens in einem Bereich von 0.6-30 nmol Phosphat (in einem Probevolumen von 30 μ l) linear zunimmt.

Aufgrund des deutlich geringeren zeitlichen Aufwands und der größeren Empfindlichkeit wurde für die Messung sämtlicher Aktivitätswerte der Phosphat-Assay verwendet.

Für die Aktivitätsbestimmung wurden durch Ultraschall jeweils 30-50 mg Zellen in 600 μ l Puffer aufgeschlossen und anschließend 10 μ l dieses Rohextrakts mit 2.8 mM Neu5Ac, 1.65 mM CTP und 2 U anorganischer Pyrophosphatase in einem Mg^{2+} -haltigen Puffer in einem Gesamtvolumen von 500 μ l bei 37° C inkubiert. Nach 5, 10, 15 und 30 Minuten wurden jeweils 30 μ l des Ansatzes mit Hilfe des oben beschriebenen Phosphat-Assays vermessen.

4.2.2. Proteingehaltsbestimmung

Um den Verlauf einer Enzympräparation nicht nur quantitativ (Gesamtaktivität) sondern auch qualitativ bewerten zu können, bedarf es neben der Bestimmung der Gesamtaktivität zusätzlich noch einer Bestimmung des Gesamtproteingehalts. Durch Relation der Gesamtaktivität zu dem Gesamtproteingehalt einer Lösung kann eine Aussage über die Anreicherung des zu reinigenden Proteins im Vergleich zum Restprotein gemacht werden. Man spricht hierbei von der spezifischen Aktivität, welche durch das Verhältnis der Aktivität U [$\mu\text{mol}/\text{min}$] bezogen auf die Proteinmenge [mg] definiert ist.

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts einer Lösung kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, wobei darauf geachtet werden muß, daß die verwendete Meßmethode einerseits spezifisch für die Stoffklasse ist, andererseits aber nicht zwischen verschiedenen Proteinen unterscheidet.¹⁹⁵ Häufig angewendete Methoden sind (1) die Biuret-Methode,¹⁹⁶ eine relativ unempfindliche Methode, bei der mg -Mengen an Protein benötigt werden, (2) die Lowry-Methode,¹⁹⁷ eine leicht modifizierte Art der Biuret-Methode, die weit empfindlicher ist, aber durch Puffersubstanzen und Salze gestört wird, sowie (3) die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode von *Bradford*.¹⁹⁸ Das Prinzip der letzteren Methode beruht auf Wechselwirkungen zwischen Proteinen und dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250. Die Ausbildung eines Protein-Farbstoff-Komplexes verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm, so daß der Proteingehalt mit Hilfe einer vorab erstellten Eichgerade photometrisch bestimmt werden kann. Als Standard für die Eichgerade kann neben dem (oft nicht zur Verfügung stehenden) zu vermessenden Protein selbst alternativ auch Rinderserumalbumin oder γ -Globulin verwendet werden. Die Proteinbestimmung wird hierbei weder durch Salze noch durch Puffersubstanzen gestört und ist mit Hilfe eines von der Firma Bio-Rad kommerziell erhältlichen Kits innerhalb kurzer Zeit durchführbar.

4.2.3. Enzympräparation

Fermentation

Die Aufzucht des rekombinanten *E. coli*-Stamm JM105/pKKCMP¹ erfolgte nach Standardverfahren, die sich im Arbeitskreis bei vergleichbaren Expressionssystemen bewährt haben.^{199,200} Dazu wurden die Zellen in einem Vollmedium kultiviert, das neben Caseinhydrolysat auch Hefeextrakt als Nährstoffquelle und den Selektionsmarker Ampicillin enthält. Der Ablauf der Fermentation erfolgte in drei Stufen: zunächst wurden Bakterien einer Stammkultur auf einer LBA-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37° C bebrütet, bevor sie in eine 200 ml-Schüttelkultur überführt und 6-8 h lang vorinkubiert wurden. Mit dieser Schüttelkultur wurde anschließend ein 10 l-Fermenter beimpft.²⁰¹ In der Adaptionsphase direkt nach dem Animpfen erhöhte sich die Biomasse kaum, da sich der Stoffwechsel der Zellen erst auf die veränderten Bedingungen einregeln mußte. In der anschließenden logarithmischen Wachstumsphase mit einer Verdopplungszeit von ca. 20 Minuten wurden die Zellen durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration von 0.5 mM) induziert und noch weitere 8-10 h kultiviert. Durch die Induktion wird das Zellwachstum reduziert und ein großer Teil der Energie der Zellen in die Proteinbiosynthese gesteckt. Das Ernten der Zellen erfolgte schließlich mittels Durchflußzentrifugation.

Zellaufschluß

Für die Reinigung der im Zellinneren gelösten Enzyme müssen die Bakterienwände aufgeschlossen werden, wobei die Zerstörung der Zellwände – abhängig von der Zellmenge - mit unterschiedlichen Methoden erfolgen kann. Kleine Zellmengen bis ca. 5 g Feuchtgewicht wurden durch Ultraschall, größere Mengen durch Naßvermahlung mit Glasperlen in einer Kugelmühle aufgeschlossen. Bei diesen mechanischen Zellaufschlüssen, bei denen hohe Scherkräfte die Zellen zum Platzen bringen, werden große Wärmemengen frei. Um eine daraus resultierende Proteindenaturierung sowie proteolytischen Abbau zu minimieren, muß darauf geachtet werden, daß der Rohextrakt während des Aufschlußvorgangs effizient gekühlt wird.

¹ Ich danke Frau Dr. Knorst für die Überlassung entsprechender Stammkulturen

Die Reinigung des so erhaltenen Rohextrakts erfolgte in zwei Stufen (Anionenaustauschchromatographie und Ammoniumsulfatfällung), wodurch reine Enzymfraktionen mit hoher spezifischen Aktivität erhalten werden konnten.

Ionenaustauschchromatographie

Proteine können entsprechend ihrer unterschiedlichen Nettoladung mittels Ionenaustauschchromatographie voneinander getrennt werden. Als Ionenaustauscher wurde hier DEAE-Sepharose, ein Anionenaustauscher mit schwach basischen Diethylaminoethyl-(DEAE)-Gruppen an einer Polysaccharid-Matrix verwendet. Aufgrund ihrer negativen Nettoladung binden Proteine an das Säulenmaterial und können dann mit einem Salzgradienten (in der Regel NaCl) in Abhängigkeit ihrer Ionenstärke wieder eluiert werden.^{202,203}

Ammoniumsulfatfällung

Gelöste Proteine stehen wegen ihrer vielen funktionellen Gruppen, die zu ionischen und dipolaren Wechselwirkungen befähigt sind, in einem komplexen Gleichgewicht mit dem sie umgebenden Solvens. Dabei sind Anzahl und Verteilung von Ladungen und polaren Gruppierungen an der Oberfläche charakteristisch für jedes Protein und bestimmen seine spezifische Löslichkeit. Unter dem Einfluß hoher Salzkonzentrationen können allerdings Ladungen an der Oberfläche der Proteine neutralisiert, die effektive Wasserbindungskapazität und die Löslichkeit herabgesetzt und als Folge davon das Protein reversibel gefällt werden. Dieser Vorgang tritt bei einer für jedes Protein charakteristischen Salzkonzentration ein und kann daher zur Aufreinigung genutzt werden.²⁰³ Verwendet werden können neutrale oder schwach saure Salze wie NaCl, Na₂SO₄ oder (NH₄)₂SO₄, wobei letzteres wegen seiner geringen Lösungswärme und der hohen erreichbaren Molarität zur Aufreinigung der CMP-Sialat-Synthetase eingesetzt wurde.

Die nach Standardprotokoll durchgeführte Fermentation des rekombinanten *E. coli*-Stamm JM105/pKKCMP erbrachte insgesamt 27.0 g Zellen mit einer Gesamtaktivität von ca. 20.000 U (ca. 2.000 U/l Kultur; 740 U/g Zellen). Die geernteten Zellen wurden bei -18° C gelagert und bei Bedarf in kleinen Portionen (1-8 g) aufgeschlossen und gereinigt.

Die Ergebnisse der CMP-Sialat-Synthetase-Aufreinigung, bei denen 2.5 g Zellen aufgearbeitet wurden, sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

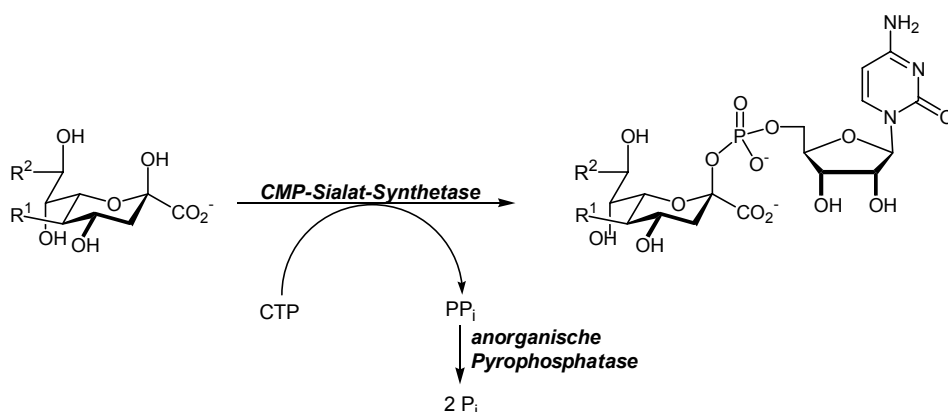
Tabelle 3: Aufreinigung der CMP-Sialat-Synthetase

	Volumen	Aktivität	spezifische Aktivität	Gesamtaktivität	Ausbeute
	[ml]	[U/ml]	[U/mg]	[U]	[%]
Rohextrakt	38	50.6	8.6	1923	100
Chromatographie (DEAE-Sepharose)	112	18.1	93.8	2027	105
Ammoniumsulfatfällung (50%)	20	80.8	101.4	1616	84

Mit lediglich zwei Aufreinigungsschritten – unter nur geringen Verlusten der Gesamtaktivität – konnten ausreichend hohe spezifische Aktivitäten von ca. 100 U/mg Protein erreicht werden.

4.3. Substratspektrum der CMP-Sialat-Synthetase

Wie Untersuchungen von Frau Dr. Knorst im Arbeitskreis zeigten, zeichnet sich das hier untersuchte, rekombinante Enzym aus *N. meningitidis* durch seine breite Substrattoleranz aus. So werden eine Reihe von an C5-modifizierten Neuraminsäure-Derivate als Substrate akzeptiert, die von der kommerziell erhältlichen, Synthetase aus *E. coli*, dem bisher einzigen für die Syntheseanwendungen untersuchten bakteriellen Enzym, nicht akzeptiert werden.⁵²

Tabelle 4: Substrattoleranz der CMP-Sialat-Synthetase aus *Neisseria meningitidis* Sero-
gruppe B

	R¹	R²
Neu5Ac	NHAc	CH ₂ OH
Neu5Prop	NHProp	CH ₂ OH
Neu5Acryl	NHAc	CH ₂ OH
Neu5Cbz	NHCbz	CH ₂ OH
Neu5Alloc	NHAlloc	CH ₂ OH
KDN	OH	CH ₂ OH
4,6-bisepi-KDO	OH	H

Gegenstand dieser Studie sollte nun sein, ob auch deutlich stärker vom natürlichen Substrat Neu5Ac abweichende Sialinsäurestrukturen von der CMP-Sialat-Synthetase aus *Neisseria meningitidis* Serogruppe B akzeptiert werden.

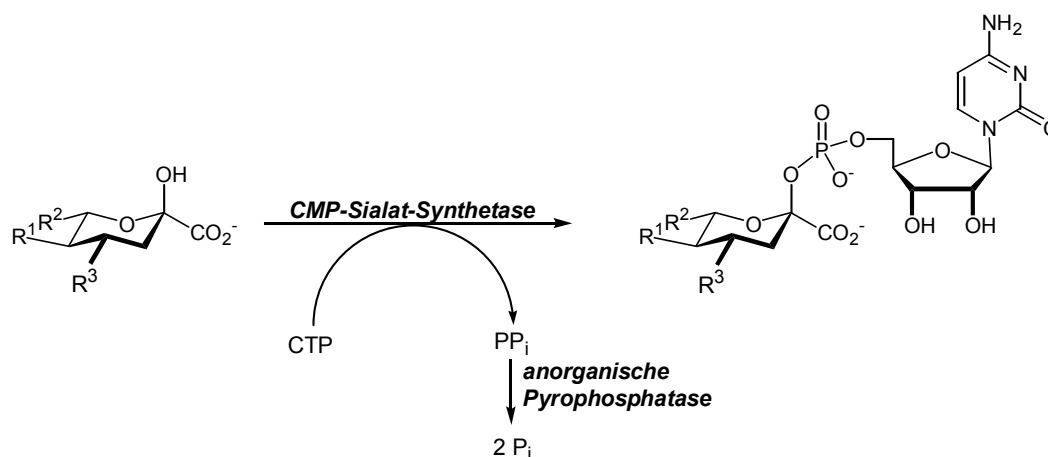
Von besonderem Interesse war hierbei, ob diese rekombinante CMP-Sialat-Synthetase – neben der bekannten Toleranz gegenüber an C5-modifizierten Sialinsäurestrukturen – zusätzliche Modifikationen, wie die Verkürzung der Kohlenstoffkette zu C6- bzw. C7-Sialinsäurederivaten zuläßt und auch derart abgewandelte Sialinsäureeinheiten als Substrat umsetzt.

Die zur Bestimmung der Substrattoleranz der Synthetase zur Verfügung stehenden Neuraminsäure-Derivate waren, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, über eine Reaktionssequenz erhalten worden, die in allen Fällen als Schlüsselschritt eine Indium-vermittelte Allylierung von entsprechend modifizierten Aldehyden beinhaltete. Es war daher zu berücksichtigen, daß als Folge dieser metall-vermittelten Reaktion Spuren von Indiumsalzen an den synthetisierten Neuraminsäure-Derivaten anhaften und somit die enzymatischen Umsetzungen beeinflussen könnten. Sämtliche Neuraminsäure-Derivate wurden daher auf Indium-haltige Verunreinigungen hin untersucht. Das hier verwendete analytische Verfahren – die Bildung eines Farbkomplexes mit Alizarin S – besitzt eine Grenzkonzentration von $pD = 5.7$ (d.h. 1 g Indiumsalze sind in ca. 500 l Lösung detektierbar) bei einer Nachweisgrenze von 50 ng Indium.^{87,88} Bei keinem der eingesetzten Neuraminsäure-Derivate wurde diese Nachweisgrenze erreicht. Um aber zusätzlich jeglichen störenden Einfluß von eventuell verbliebenen, analytisch nicht mehr detektierbaren Indium-Verunreinigungen ausschließen zu können, wurden parallel metallorganisch und enzymatisch

synthetisierte Proben des Sialinsäure-Derivats KDN im Aktivitätsassay vermessen, wobei die untersuchten Proben unabhängig von ihrer Herkunft identische Reaktionsgeschwindigkeiten zeigten. In Kombination mit dem negativen Indium-Nachweis konnten somit Störungen der enzymatischen Assays durch Faktoren, deren Ursachen im gewählten Syntheseweg lägen, praktisch ausgeschlossen werden.

Zur Ermittlung des Substratspektrums der Synthetase wurden die synthetischen Sialinsäure-Derivate (aus Kap. III.1-III.3) anstelle des natürlichen Substrats Neu5Ac in dem oben beschriebenen Enzymassay (III.4.2.1) getestet. Dazu wurde das entsprechende Derivat in Gegenwart von CTP in Mg^{2+} -haltigem Tris-Puffer mit der CMP-Sialat-Synthetase und anorganischer Pyrophosphatase bei 37°C inkubiert und der Reaktionsverlauf über einen Zeitraum von 30 Minuten halbquantitativ mittels Phosphat-Bestimmung nach *Lanzetta* kontrolliert.

Tabelle 5: Substrattoleranz der CMP-Sialat-Synthetase aus *Neisseria meningitidis* Sero-
gruppe B



Edukt		R ¹	R ²	R ³	Substrattoleranz
Neu5Ac	e.p.	NHAc	CHOH-CHOH-CH ₂ OH	OH	+++
<i>iso</i> -Neu5Ac ²	e.p.	OH	CHOH-CHOH-CH ₂ OH	NHAc	–
KDN 8	e.p.	OH	CHOH-CHOH-CH ₂ OH	OH	++
4,6-bisepi-KDO 18	e.p.	OH	CHOH-CH ₂ OH	OH	++
Neu5PhAc 98	e.p.	NHPhAc	CHOH-CHOH-CH ₂ OH	OH	++
20	e.p.	OH	CH ₂ OH	OH	+
71	rac.	N ₃	CH ₂ OH	OH	+
72	rac.	NHAc	CH ₂ OH	OH	+
73	rac.	NHPhAc	CH ₂ OH	OH	+
74	rac.	NHFmoc	CH ₂ OH	OH	+
85	rac.	H	CH ₂ -CH ₂ OH	OH	+
25	e.p.	OH	H	OH	–
50	rac.	N ₃	H	OH	–
51	rac.	NHAc	H	OH	–
52	rac.	NHPhAc	H	OH	–
53	rac.	NHFmoc	H	OH	–
54	rac.	NHCbz	H	OH	–

+++ : natürliche Substrat; ++ : gutes Substrat; + : durchschnittliches Substrat; – : kein Substrat
e.p. : enantiomerenrein; rac. : racemisch

In **Tabelle 5** sind die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Sialinsäure-Derivate aufgelistet und deren Eignung als Substrate der CMP-Sialiat-Synthetase dokumentiert.

Von besonderem Interesse in dieser Studie war der Einfluß der Kohlenstoff-Seitenkette R² der Sialinsäureeinheit auf ihre Substrateigenschaft. Da bislang noch kein enzymatischer Zugang zu C6- bzw. C7-Sialinsäuren in der Literatur beschrieben wurde, konnte bisher auch noch keine bekannte Synthetase auf ihre Akzeptanz gegenüber solchen Derivaten untersucht werden. Wie die in **Tabelle 5** zusammengefaßte Studie aufzeigt, übt sowohl die Existenz als auch die Qualität der Seitenkette R² einen elementaren Einfluß aus. Während sowohl die desaminierte Neuraminsäure KDN als auch das entsprechende um eine CHOH-Gruppe verkürzte C8-Derivat **18** – im Gegensatz zu anderen, bisher bekannten CMP-Sialat-

² Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Dondoni, Università Ferrara, Italien für die Überlassung einer Probe *iso*-Neu5Ac.

Bezüglich an C5-modifizierten Sialinsäure-Derivaten zeichnet sich das hier untersuchte, rekombinante Enzym aus *N. meningitidis* durch ein breites Substratspektrum aus. So wurden sowohl das Azid-funktionalisierte Derivat **71**, als auch die Derivate **73** und **74** mit ihren sterisch anspruchsvollen Gruppen (NHPhAc bzw NHFmoc) von der Synthetase klar als Substrate akzeptiert.

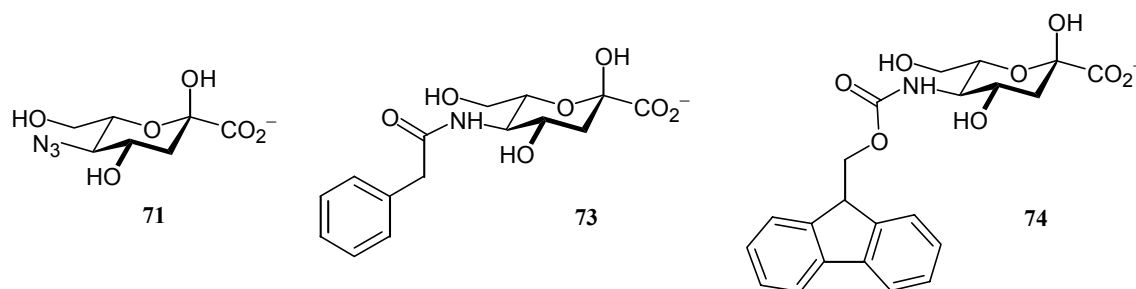


Abb. 81: 5-*N*-substituierte C7-Sialinsäuren als Substrate der CMP-Sialat-Synthetase

Mit ihrer guten Zugänglichkeit und breiten Substrattoleranz bietet die Synthetase, in Kombination mit der Indium-vermittelten Synthese von modifizierten Sialinsäure-Derivaten, somit eine hervorragende Grundlage für einen chemoenzymatischen Zugang zu neuartigen sialinsäurehaltigen Glycokonjugaten.

4.4. Enzymatische Synthesen mit der CMP-Sialat-Synthetase

Die präparative enzymatische Synthese von CMP-Neu5Ac aus CTP und *N*-Acetylneuraminsäure mit Hilfe der CMP-Sialat-Synthetase aus *E. coli* ist breit dokumentiert.^{189-191,205,206} Entscheidend für die Aktivität der Synthetase ist hierbei der Zusatz von zweiwertigen Metallsalzen wie Mg^{2+} bzw. Mn^{2+} , sowie der Einsatz von Antioxidantien wie Dithiothreitol, Mercaptoethanol oder Cystein. Wegen der bereits bei schwach saurem pH-Wert (5.0 bis 6.9) extremen Hydrolyseempfindlichkeit der gebildeten Produkte muß die Umsetzung ausreichend gepuffert (50 mM Tris-HCl; pH 8.5) bei schwach basischem pH-Wert durchgeführt werden. Das bei der Reaktion freigesetzte Pyrophosphat kann als Inhibitor der Synthetase wirken und muß daher durch den Zusatz einer Pyrophosphatase zu Phosphat gespalten werden. In Gegenwart des Mg^{2+} -Cofaktors wird letzteres als schwerlösliches

Magnesium-Ammonium-Salz gefällt und so aus der Reaktion entfernt; daher muß auf den Erhalt einer ausreichenden Mg^{2+} -Konzentration über den Reaktionsverlauf geachtet werden.

Exemplarisch konnten auf diese Weise die im Aktivitätsassay als gute Substrate der Synthetase erkannten Sialinsäuren **8** und **98** in guten Ausbeuten zu den entsprechenden CMP-Konjugaten **99** (78%) und **100** (67%) umgesetzt werden. Die Produkte konnten durch fraktionierende Fällung mit Ethanol sowie Reinigung durch Chromatographie an BioGel P-2 (Größenausschlußchromatographie) von Protein und Puffersalzen befreit und NMR-spektroskopisch identifiziert (**99**) bzw. neu charakterisiert (**100**) werden. Nach Lyophilisation können die voluminösen farblosen Feststoffe bei -80°C gelagert werden, wobei auch nach längerer Lagezeit (> 6 Monate) NMR-spektroskopisch kein hydrolytischer Zerfall der CMP-Konjugate beobachtet wird.

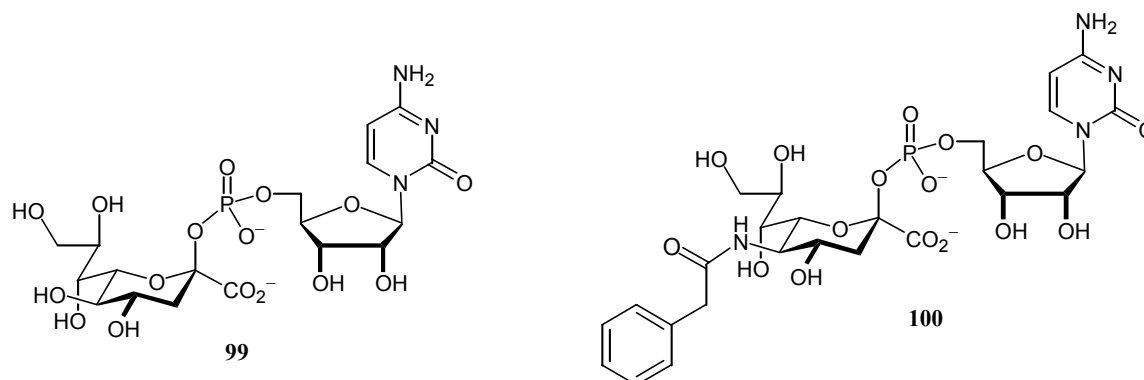


Abb. 82: Chemoenzymatisch synthetisierte CMP-Konjugate

Eine präparative CMP-Aktivierung der kurzkettigen C7-Sialinsäure-Derivate **20** und **71-74**, die im Assay von der CMP-Sialat-Synthetase kinetisch mit deutlich langsamerer Geschwindigkeit umgesetzt werden, gelang dagegen nicht. Zwar zeigte die DC-Kontrolle der Reaktionen eine erkennbare Produktbildung an, aber vermutlich aufgrund der extremen Hydrolyseempfindlichkeit der Produkte konnten letztere weder isoliert noch im Reaktionsgemisch NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Diese beobachtete Empfindlichkeit war jedoch weniger überraschend, da sie im Einklang mit den Ergebnissen aus Untersuchungen zum Stabilitätsverhalten verwandter CMP-aktivierter Sialinsäuren (z.B. CMP-KDO) steht.²⁰⁷ Der extreme Anstieg der Hydrolyseempfindlichkeit von CMP-KDO ($t_{1/2} = 0.57$ h) im Vergleich zum CMP-Neu5Ac-Konjugat ($t_{1/2} = 151$ h) wird hierbei unter anderem

durch das Auftreten einer Twist-Boot-Form des CMP-KDO-Konjugats erklärt. Diese Twist-Boot-Form konnte NMR-spektroskopisch zwar nicht nachgewiesen werden, jedoch lassen analoge Strukturen der freien Sialinsäure KDO letztere auch im entsprechenden CMP-Konjugat erwarten.

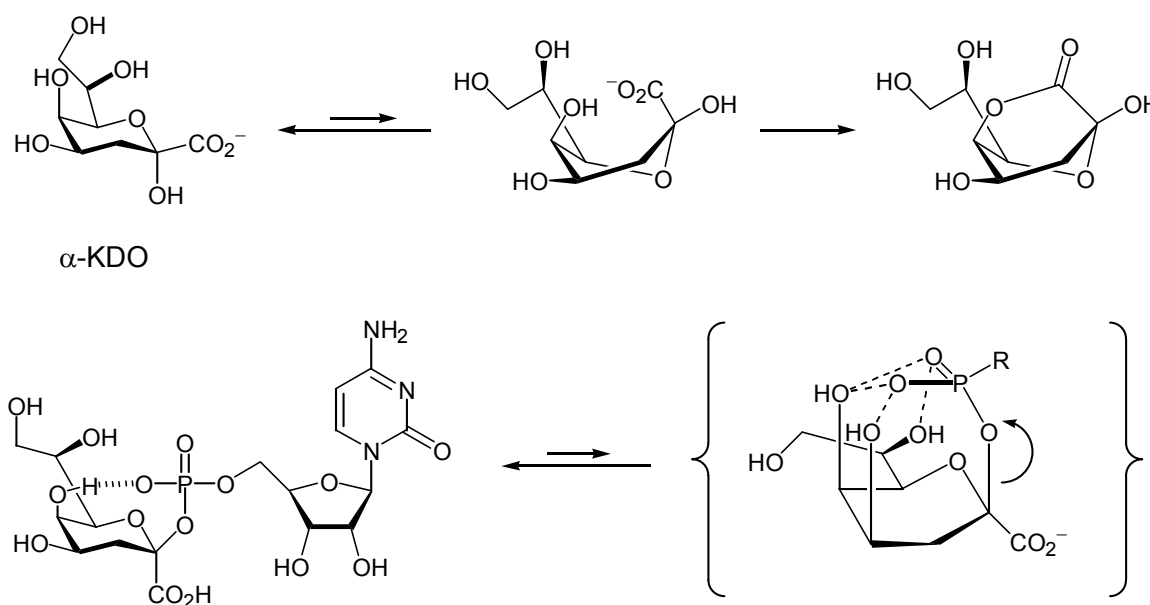


Abb. 83: Bildung des α -KDO 1,5-Lactons und vermutete Analogie für CMP- β -KDO²⁰⁷

Die aus dieser Twist-Boot-Form resultierenden Wechselwirkungen der 4-, 5- bzw. 7-Hydroxylgruppe mit der Phosphatgruppe fördern die Spaltung der glycosidischen Bindung und scheinen daher hauptverantwortlich für die Hydrolyseempfindlichkeit solcher CMP-Konjugate zu sein. Eine analoge Twist-Boot-Form könnte auch im Falle der C7-Sialinsäuren angenommen werden und somit die beobachtete extreme Hydrolyseempfindlichkeit erklären. CMP-aktivierte Zucker werden zudem – wie breit dokumentiert – sowohl unter neutralen als auch unter alkalischen, besonders aber unter sauren Bedingungen hydrolysiert.²⁰⁷⁻²¹⁰ In solchen Fällen, in denen eine Isolierung der labilen CMP-aktivierten Zwischenprodukte scheitert, bietet sich alternativ eine kontinuierliche Strategie an, nach der der enzymatische Schritt der CMP-Aktivierung in situ mit dem enzymatischem Sialyltransfer gekoppelt wird (s.u.).²¹¹⁻²¹³

4.5. Enzymatischer Sialyltransfer

Die enzymatische Synthese von Sialinsäure-haltigen Glycokonjugaten basiert auf der Übertragung der CMP-aktivierten Sialinsäure auf geeignete Sialyl-Akzeptorverbindungen, wobei der Transfer von Sialyltransferasen katalysiert wird (s. III.4.1.), die mittlerweile auch kommerziell erhältlich sind. Dieser Prozeß kann prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen, die sich in ihrer diskontinuierlichen oder kontinuierlichen Vorgehensweise unterscheiden.

Bei der diskontinuierlichen Methode wird primär die Sialinsäure enzymatisch unter Verbrauch von CTP aktiviert und das gebildete CMP-Konjugat isoliert. Das so gebildete CMP-Konjugat kann dann in einem separaten zweiten Schritt mit einer Sialyltransferase in Gegenwart der Sialyl-Akzeptorverbindung zum Sialinsäure-haltigen Glycokonjugat umgesetzt werden.^{214,215} Eine Inhibierung der Sialyltransferase durch das bei der Umsetzung entstehende CMP wird durch Zugabe einer kommerziell erhältlichen alkalischen Phosphatase vermieden, die die Hydrolyse von CMP zu Cytidin und Phosphat katalysiert.^{162,169}

Ist eine Isolierung der für das diskontinuierliche Verfahren benötigten CMP-Konjugate unmöglich oder unerwünscht, so können alternativ für eine kontinuierliche Verfahrensweise die beiden separaten enzymatischen Schritte der CMP-Aktivierung und des Sialyltransfers in Form eines Nucleotid-Regenerierungszyklus miteinander gekoppelt werden.^{47,211-213}

Bei dieser Methode wird ausgehend von dem entsprechenden Sialinsäure-Derivat, der Sialyl-Akzeptorverbindung, Phosphoenolpyruvat und katalytischen Mengen an CMP und ATP sowie 5 Enzymen (Sialyltransferase, CMP-Sialat-Synthetase, anorganischer Pyrophosphatase, Pyruvatkinase, Nucleosidmonophosphatkinase) die Sialinsäure *in situ* CMP-aktiviert und – unter kontinuierlicher Regenerierung von CTP aus CMP – auf die Akzeptorverbindung übertragen.

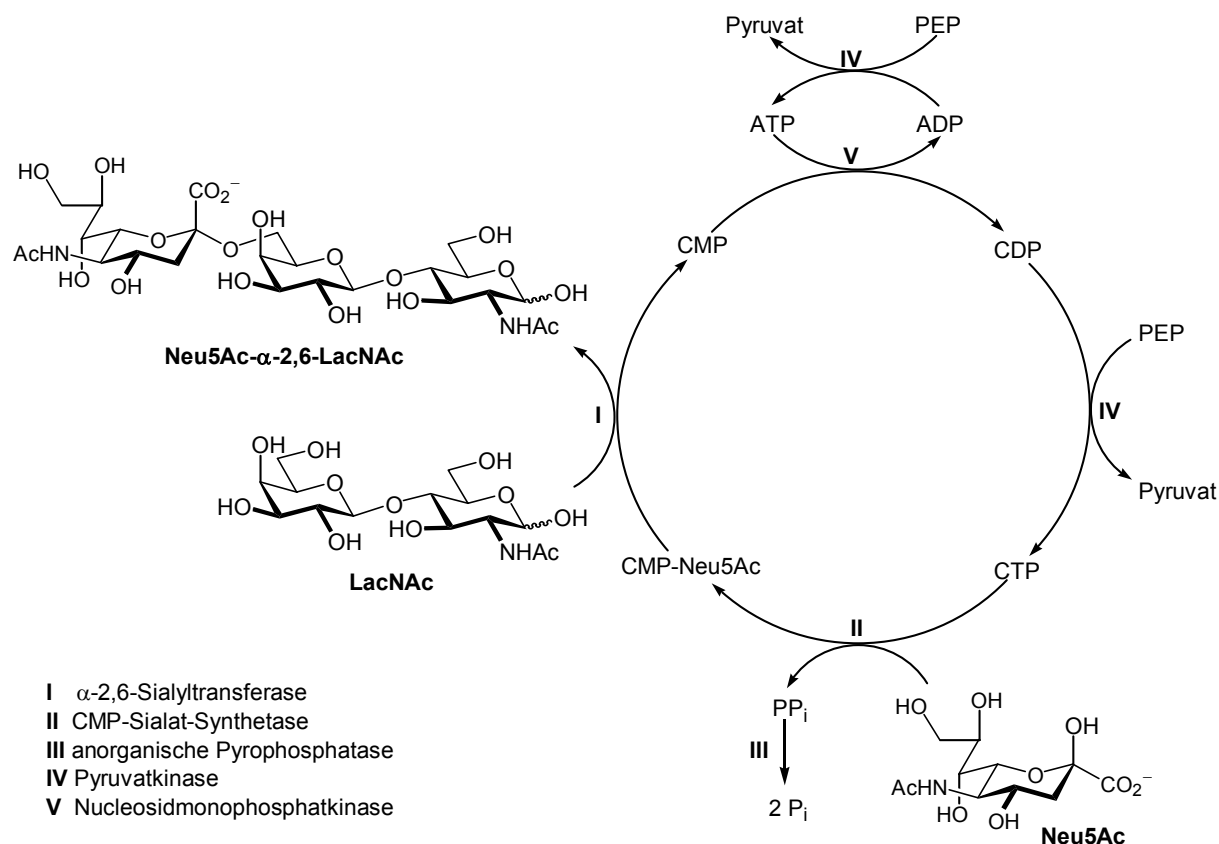


Abb. 84: Kontinuierliche Synthese von Sialyl-N-acetylactosamin

Da die CMP-Konjugate der C7-Sialinsäure-Derivate **20** und **71-74** wegen ihrer Hydrolyseempfindlichkeit nicht zu isolieren waren, wurde nun versucht, die entsprechenden Sialinsäureeinheiten auf N-Acetylactosamin, das natürliche Substrat der α -2,6-Sialyltransferase nach der hier beschriebenen kontinuierlichen Methode zu übertragen.

Die durchgeführten multienzymatischen Umsetzungen erbrachten jedoch nicht die gewünschten Resultate, so daß in keinem Fall die entsprechenden Trisaccharide isoliert werden konnten.

Zwar könnte einerseits in der Hydrolyseempfindlichkeit der *in situ* generierten CMP-Konjugate eine Ursache für das Scheitern der Übertragung der Sialinsäureeinheiten auf die Akzeptorverbindung zu finden sein, andererseits könnte auch die hier verwendeten α -2,6-Sialyltransferase aus Rattenleber wegen evtl. fehlender bzw. geringer Substrattoleranz gegenüber C7-Sialinsäure-CMP-Konjugaten einen limitierenden Einfluß ausüben, eine konkrete Aussage kann jedoch nicht gemacht werden. Wegen der vielen potentiellen Fehlerquellen dieser multienzymatischen Umsetzung scheint es daher sinnvoller zu sein

solche Kopplungen unter Einsatz von äquimolaren Mengen an CTP (unter Verzicht auf den CMP-CTP-Recycling-Zyklus) durchzuführen. Entsprechende Umsetzungen sollen Gegenstand fortführender Studien sein.

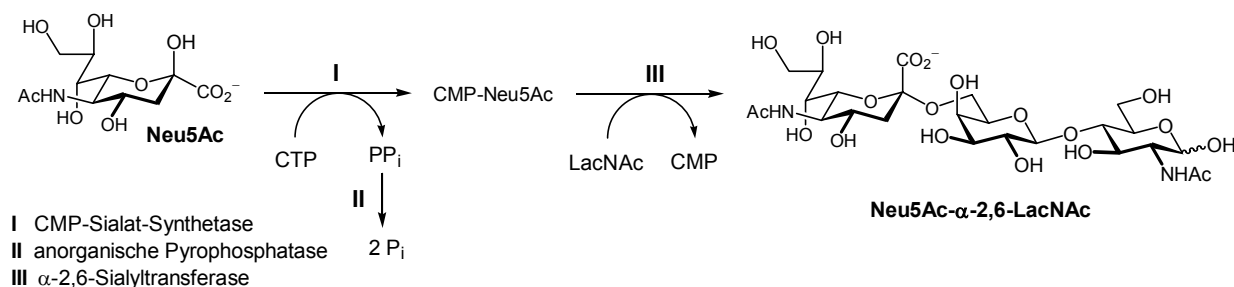


Abb. 85: Kontinuierliches Verfahren ohne Regenerierung von CTP aus CMP

Am Beispiel der Sialinsäure **98** (Neu5PhAc) sollte nun der präparative Nutzen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten chemoenzymatischen Synthese von Sialinsäurehaltigen Glykokonjugaten demonstriert werden. Speziell ein derart *N*-geschütztes sialyliertes Trisaccharid würde wegen der mittels Penicillinacylase leicht zu modifizierenden Aminschutzgruppe als ausgezeichnete Ausgangsverbindung zur Synthese von modifizierten Sialokonjugaten fungieren können. Entsprechende Untersuchungen sowohl an der freien Sialinsäure **98** als auch am CMP-Konjugat **100** zeigten, daß die enzymatische Deblockierung der Aminfunktion selektiv und unter äußerst milden Bedingungen durchführbar ist

Da das entsprechende CMP-Konjugat **100** aus der vorab durchgeführten Umsetzung mit der CMP-Sialat-Synthetase bereits zur Verfügung stand, wurde der enzymatische Sialyltransfer nach dem diskontinuierlichen Verfahren versucht. In der Tat konnte auf diese Weise das aktivierte CMP-Konjugat **100** mit *N*-Acetyllactosamin unter Katalyse von α -2,6-Sialyltransferase mit einer Ausbeute von > 40% (4.0 mg) zu dem entsprechenden Trisaccharid **101** umgesetzt werden, welches durch Chromatographie an BioGel P-2 aufgereinigt und in Form eines farblosen Feststoffs mit einem Anomerenverhältnis von $\alpha/\beta = 1/1$ erhalten werden konnte.

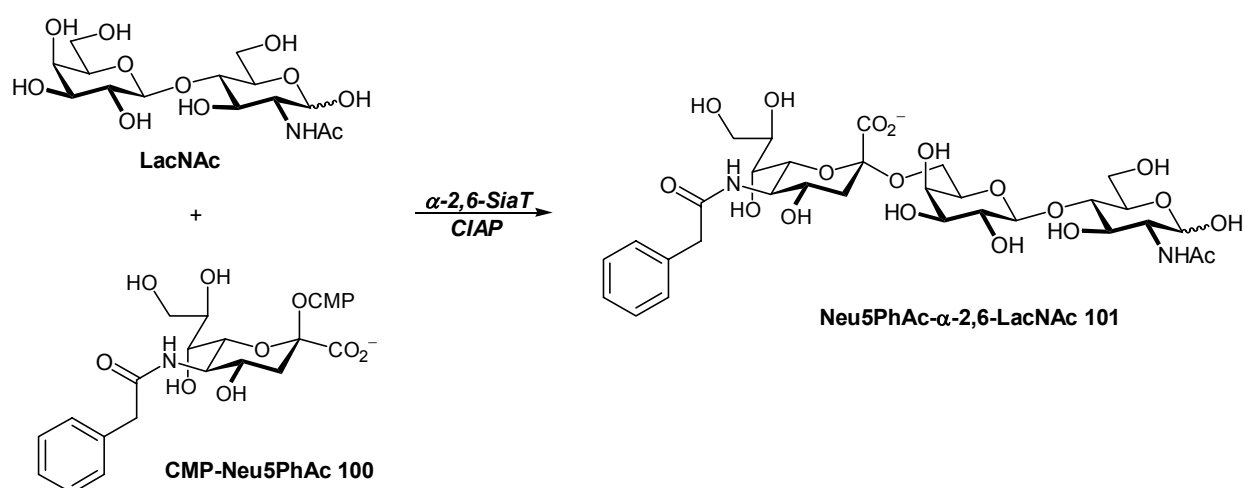


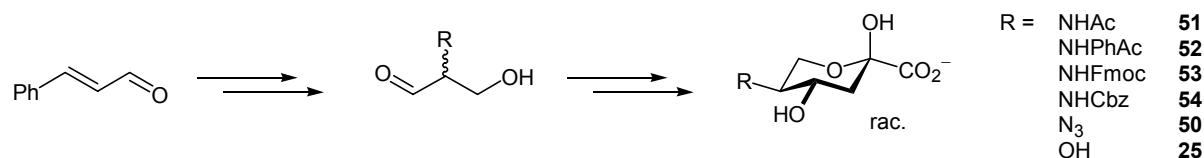
Abb. 86: Enzymatische Synthese des Trisaccharids **101**

IV. Zusammenfassung und Ausblick

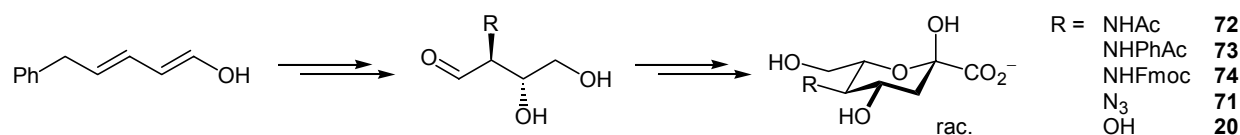
• Indium-vermittelte Synthese von Sialinsäure-Analoga

Die für die Synthese von C9- bzw. C8-Sialinsäure-Analoga bewährte Indium-vermittelte Allylierung von Aldosen konnte auf die Synthese von neuen C6- respektive C7-Sialinsäurestrukturen ausgeweitet werden. Durch den Einsatz eines aciden Lösungsmittelsystems konnte hierbei die Indium-vermittelten Allylierungen praktisch vollständig diastereoselektiv geführt werden.

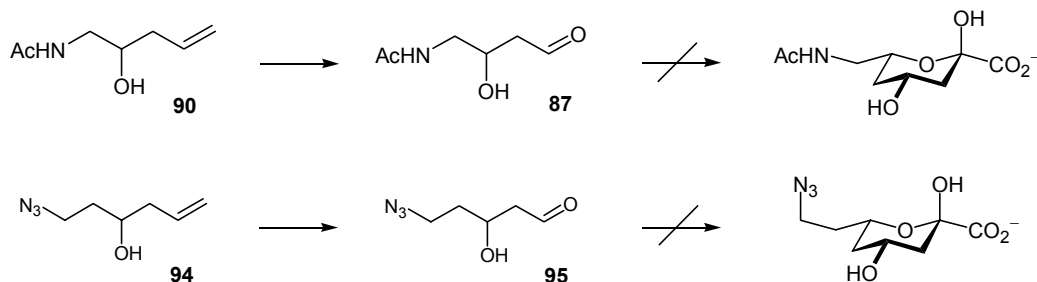
Ausgehend von Zimtaldehyd gelang mit hohen Ausbeuten die Synthese der chemisch sensitiven Glycerinaldehyd-Derivate, die Indium-vermittelt zu den entsprechenden C6-Sialinsäure-Analoga umgesetzt werden konnten.



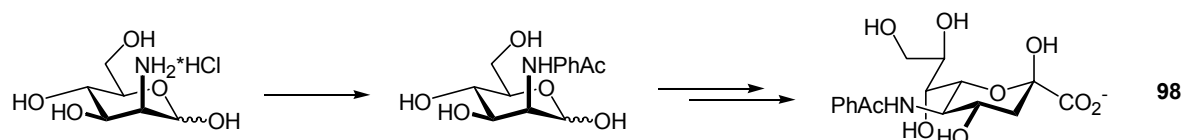
Die für die Synthese neuer C7-Sialinsäure-Analoga benötigten Erythrose-Derivate konnten in einer analogen Prozedur aus dem Azid **57** synthetisiert und mittels der bewährten Barbier-Reaktion in die entsprechenden Sialinsäure-Derivate überführt werden.



Die Synthese verkürzter, endständig N-funktionalisierter Sialinsäure-Analoga gelang indes aufgrund der chemischen Instabilität entsprechender aldehydischer Vorstufen (**87**, **94**) nicht.

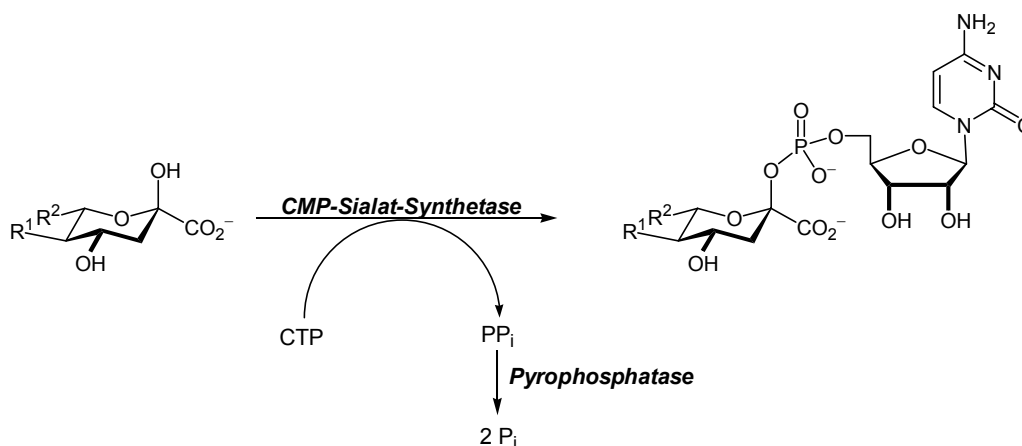


Parallel gelang ausgehend von dem kommerziell verfügbaren D-Mannosamin die Synthese der leicht mittels Penicillinacylase modifizierbaren *N*-Phenylacetyl-geschützten Neuraminsäure **98**.



- **Substrattoleranz der CMP-Neu5Ac-Synthetase**

Mit dem rekombinanten *E. coli*-Stamm JM105 / pKKCMP konnte die CMP-Sialat-Synthetase mit Aktivitäten von 2000 U pro Liter Kultur bzw. 740 U pro Gramm Zellen gewonnen werden. Mittels eines zweistufigen Reinigungsverfahren konnte die so erzeugte Synthetase in guter Ausbeute mit hoher spezifischer Aktivität (>100 U/mg Protein) erhalten und zur Bestimmung ihrer Substrattoleranz eingesetzt werden.



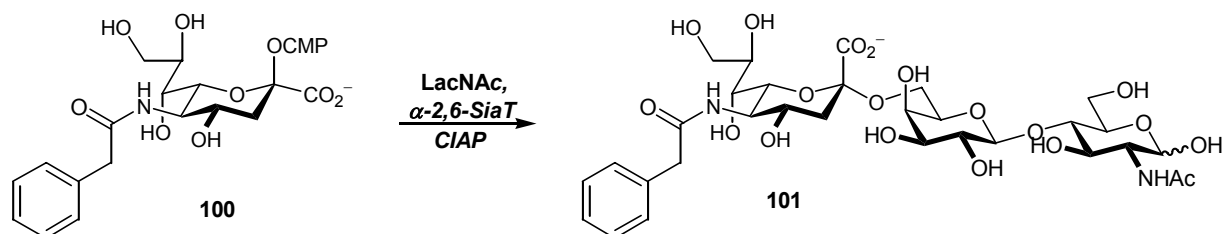
Die rekombinante CMP-Sialat-Synthetase zeichnet sich durch eine breite Substrattoleranz aus. So wurden sämtliche Indium-vermittelt synthetisierten, nicht-natürlichen C7-Sialinsäure-Analoga (**20**, **71-74**) unter Assay-Bedingungen von der Synthetase als Substrat akzeptiert, wobei die zum Teil sterisch recht anspruchsvollen Modifikationen an der C5-Position kaum einen nachteiligen Einfluß auf die Substrateigenschaften ausübten. Als elementar zeichnete sich hierbei der Minimum-Rest $R^2 = \text{CH}_2\text{OH}$ aus, da die zu den C7-Sialinsäuren analogen C6-Sialinsäuren ($R^2 = \text{H}$) nicht mehr von der CMP-Sialat-Synthetase akzeptiert wurden.

Die Indium-vermittelt synthetisierten C9-Sialinsäuren **8** (KDN) und **98** (Neu5PhAc) konnten mit der rekombinanten CMP-Sialat-Synthetase enzymatisch im präparativen Maßstab mit guten Ausbeuten zu den entsprechenden CMP-Konjugaten **99** und **100** umgesetzt werden.

Eine CMP-Aktivierung der C7-Sialinsäuren konnte dünnschichtchromatographisch eindeutig detektiert werden jedoch gelang eine Isolierung der entsprechenden CMP-Konjugate im präparativen Maßstab vermutlich begründet in deren hohen Hydrolyseempfindlichkeit nicht. Auch die Versuche einer *in situ* CMP-Aktivierung gekoppelt mit einem direkten - durch eine α -2,6-Sialyltransferase katalysierten – Sialyltransfer scheiterten. Neben der extremen Hydrolyseempfindlichkeit entsprechender CMP-Konjugate konnte wegen der Komplexität dieser multienzymatischen Umsetzung und den damit verbunden zahlreichen potentiellen Fehlerquellen keine konkrete Begründung für das Scheitern des Sialyltransfers geliefert werden. Der Verzicht auf den CMP-CTP-Recycling-Cyclus durch den Einsatz von äquimolaren Mengen an CTP würde entsprechende Umsetzungen deutlich vereinfachen; dies soll Gegenstand fortführender Studien sein

• Sialyltransfer

Das chemoenzymatisch hergestellte CMP-Konjugat **100** (CMP-Neu5PhAc) konnte mit *N*-Acetyllactosamin unter Katalyse einer α -2,6-Sialyltransferase zu dem entsprechenden Trisaccharid **101** umgesetzt werden.



Dieses Neu5PhAc-haltige Trisaccharid stellt hierbei, wegen der enzymatisch mittels Penicillinacylase leicht zu modifizierenden Amin-Schutzgruppe, eine ideale Ausgangsverbindung für die Synthese von neuen Sialokonjugaten dar.

V. Experimenteller Teil

1. Produktion, Reinigung und Charakterisierung der Synthetase

1.1. Geräte und Reagenzien

Geräte

Autoklav	Dampfsterilisator VST 50/70, Fa. Zirbus
Fermenter	Biostat B, Fa. Braun
Peristaltikpumpen	Pump P1, Pharmacia LKB Watson Marlow 505 U
pH-Meter	Calimatic 761, Fa. Knick
Photometer	Ultrospec Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB
Proteinchromatographie	Säulen: SuperFlo [®] 250, Fa. Sephagen Füllmaterial: DEAE-Sepharose CL-6-B, Pharmacia
Schreiber	Pharmacia LKB
Ultrafiltration	Amicon 8400 / Membran: YM 10
UV-Detektor	Pharmacia Uvicord S II
Zellaufschluß	Zelldisintegrator-S / MS 73, Fa. Bandelin
Zentrifugen	Heraeus Biofuge 28 RS Sorvall Superspeed RC2-B, DuPont

Puffer und Lösungen

Präparationspuffer Synthetase	20 mM Tris-HCl, pH 7.8 2 mM MgCl ₂ 0.02 mM Dithiotreitol
Assaylösung Synthetase	200mM Tris-HCl, pH 8.5 20 mM MgCl ₂ 0.2 mM Dithiotreitol 2.8 mM Neu5Ac

	1.65 mM CTP
	anorganische Pyrophosphatase
MG-Lösung	0.045% (w/v) Malachitgrün Hydrochlorid
AM-Lösung	4.2% (w/v) Ammoniummolybdat in 4 N HCl
Citrat-Lösung	34% (w/v) Natriumcitrat * 2 H ₂ O

Nährmedien für Animpfkulturen

LB (1 Liter)	10 g Pepton
	10 g NaCl
	5 g Hefeextrakt
LBA (1 Liter)	nach Sterilisieren Zugabe von 0.2g Ampicillin zu LB

Für Agarplatten werden vor dem Sterilisieren 1.5 g Agar pro 100 ml Medium zugesetzt.

Nährmedium für Standardfermentation

100 g Pepton
50 g Hefeextrakt
50 g NaCl
mit 9.8 l Wasser auffüllen

Nach 20 minütigem Sterilisieren bei 121°C werden 1 g Ampicillin (gelöst in 50 ml heißem Wasser) zugegeben.

Antifoam: Olivenöl (handelsüblich)

1.2. Assay für die CMP-Sialat-Synthetase

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der CMP-Sialat-Synthetase werden in einem Eppendorfgesäß erst einmal

463 µl Puffer (200mM Tris-HCl, pH 8.5 / 20 mM MgCl₂ / 0.2
mM Dithiotreitol)
10 µl 140mM Neu5Ac
3 µl 275 mM CTP
4 µl anorg. Pyrophosphatase (2 U)

zusammengegeben, gut vermischt, auf 37°C temperiert, in zwei 240 µl-Portionen aufgeteilt und jeweils mit 10 µl Enzymlösung versetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (5, 10, 15 und 30 Minuten) werden jeweils 30 µl Portionen im Phosphat-Assay vermessen. Zur Bestimmung des Nullwertes werden parallel immer Blindproben durchgeführt, bei denen die Enzym- oder aber die Neu5Ac-Lösung durch ein entsprechendes Volumen an Puffer ersetzt wird. Auf diese Weise ist es möglich, die Anwesenheit von Phosphatasen, die CTP zu CDP, CMP, Cytidin und Phosphat abbauen, in der Enzymlösung zu überprüfen und gegebenenfalls herauszumitteln.

Phosphat-Assay

Die Aktivität der CMP-Sialat-Synthetase wird anhand des stöchiometrisch entstehenden Äquivalentes an Pyrophosphat bestimmt, das enzymatisch durch Zugabe von anorganischer Pyrophosphatase zu zwei Äquivalenten Phosphat hydrolysiert und über einen Phosphat-Assay quantifiziert wird. Zur Herstellung des für den Phosphatassay nach *Lanzetta* benötigten Anfärbereagenzes werden 3 Vol MG-Lösung mit einem 1 Vol AM-Lösung zusammengegeben, mindestens 20 Minuten gerührt, über einen Papierfilter abfiltriert und pro 5 ml Lösung mit 100 µl 2% igem (w/v) Triton X-100 versetzt.

In einem Eppendorfgefäß wird die zu vermessende Probe mit einer Phosphatkonzentration zwischen 20 µM und 1 mM (0.6-30 nmol bezogen auf ein Probenvolumen von 30 µl) mit 800 µl des Anfärbereagenz versetzt und 90 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl 34% Na-Citrat-Lösung gestoppt, die Absorptionsdifferenz zu einer Blindprobe ohne Phosphat bei 646 nm gemessen und die Phosphat-Konzentration anhand einer Eichgeraden bestimmt.

Aus dem Konzentrationswert, der aus mindestens zwei Bestimmungen gemittelt wird, läßt sich nach Formel **I** die Aktivität der CMP-Sialat-Synthetase bestimmen.

$$\text{Formel I: } A = (c_{\text{Phosphat}} * V_A * V) / (2 * t * V_E)$$

mit: A = Aktivität [U/ml]

c_{Phosphat} = Konzentration an Phosphat [mmol/l]

t = Inkubationszeit [min]

V = Verdünnungsfaktor der Enzymlösung

V_A = Gesamtvolumen im Assay [ml]

V_E = Volumen der zugegebenen Enzymlösung

1.3. Proteinbestimmung nach BioRad®

10 µl der zu bestimmenden Proteinlösung (0.2-1.2 mg/ml) werden zu 500 µl einer fünffach verdünnten Bio-Rad-Reagenzlösung pipettiert, kurz umgeschwenkt und 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend wird die Absorptionsdifferenz zu einer Blindprobe ohne Protein bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichgeraden, die mit einem BSA-Standard ermittelt worden ist, bestimmt.

1.4. Fermentation

Die Fermentation erfolgt nach Standardprotokoll in drei Schritten: Die Bakterien einer Dauerkultur werden auf einer LBA-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet, bevor sie in eine 200 ml Schüttelkultur überführt und für 6-8 Stunden vorinkubiert werden. Im Anschluß wird mit dieser Schüttelkultur der Fermenter mit einem Arbeitsvolumen von 10 l beimpft. Bei Erreichen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase, d.h. einer optischen Dichte OD_{600} von 0.8-1.0 (nach ca. 4-5 h) werden die heranwachsenden Zellen durch Zugabe von 1.2 g IPTG (Endkonzentration von 0.5 mM) induziert und über Nacht kultiviert.

Während der Fermentation werden folgende Parameter eingehalten:

Drehzahl: 600 rpm

Temperatur: 37°C

Luftdurchsatz: 6 l/min

Kulturdauer: 12-15 h

Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase werden die Zellen mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge bei 20,000 g und 4°C geerntet. Das Feuchtgewicht der Biomasse aus dem 10 l Fermentationsvolumen betrug 27g. Die Zellpellets können vor der Weiterverarbeitung in Gefrierbeuteln bei -18°C gelagert werden.

1.5. Zellaufschluß

Die bei der Fermentation erhaltenen Zellen werden im entsprechenden Präparationspuffer resuspendiert (20% ige Suspension (w/v), mit 10,000 U Benzonase versetzt und mittels einer Kugelmühle mit Glasperlen zweimal aufgeschlossen. Hierzu werden 50 ml Glasperlen (0.1-0.2 mm) mit ca. 75 ml der Suspension vermischt und 15 Minuten bei 0°C und 4,000 rpm gerührt. Nachdem die Glasperlen über eine D-2-Fritte abgetrennt und feste Bestandteile 60 Minuten bei 24,000 g abzentrifugiert worden sind, wird der so erhaltene Rohextrakt direkt in den nachfolgenden Reinigungsschritten eingesetzt.

Alternativ können kleinere Mengen an Zellen (bis zu 5 g Feuchtgewicht) im Präparationspuffer in einem entsprechenden Zentrifugengefäß durch Ultraschall dreimal für 2 Minuten bei maximaler Geräteleistung aufgeschlossen werden. Um den Abbau von Proteinen durch unspezifische Proteolyse zu minimieren, wird der gesamte Zellausschluß und alle sich anschließenden Reinigungsschritte möglichst bei 0°C durchgeführt.

1.6. Reinigung der CMP-Sialat-Synthetase

Ionenaustauschchromatographie

Der zellfreie Rohextrakt wird auf eine SuperFlo®250-Säule, gepackt mit DEAE-Sepharose Cl-6-B, aufgebracht, die zuvor mit 2-3 l Präparationspuffer äquilibriert worden ist. Nachdem ein Teil des Fremdproteins durch Spülen mit 50 mM NaCl-haltigem Präparationspuffer abgetrennt worden ist, wird die Synthetase durch einen linearen Salzgradienten (50-300 mM NaCl im Präparationspuffer) bei einer Flußrate von ca. 3.0 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität werden vereinigt und direkt für die Ammoniumsulfatfällung eingesetzt.

Für die Chromatographie werden folgende Parameter gewählt:

Flußrate:	3.0 ml/min
Schreiber:	0.2 mm/min
	1000 mV
UV-Detektor:	Range AU 1.0
	Time Constant 2.0
Gradient:	800 ml 50 mM NaCl-haltiger und 800 ml 300 mM NaCl-haltiger Präparationspuffer
Fraktionen	150 Tropfen (ca. 9.6 ml)

Ammoniumsulfatfällung

112 ml der vorgereinigten Enzymlösung werden bei 4°C mit 35 g festem, feingemahlenem Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung der Lösung von 50% versetzt. Nach ca. 2 h wird das ausgefallene Protein durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 20,000 g abgetrennt und das dabei erhaltene Proteinpellet in 20 ml Präparationspuffer resuspendiert. Die so aufgereinigte Enzymlösung besitzt eine spezifische Aktivität von ca. 101 U/mg.

Substratspektrum

Zur Ermittlung des Substratspektrums der Synthetase werden eine Anzahl von strukturanalogen Derivaten (speziell C6- und C7- Analoga) des natürlichen Substrats Neu5Ac getestet. Hierzu wird bei ansonsten unveränderten Assaybedingungen, wie sie im Kapitel V.1.2. beschrieben sind, das natürliche Substrat gegen das entsprechende Strukturanaloga ersetzt und der Reaktionsverlauf mittels Phosphat-Bestimmung nach *Lanzetta* kontrolliert. Wird unter den gegebenen Assay-Bedingungen kein oder nur ein sehr schlechter Umsatz beobachtet, wird die Reaktion bei höherer Enzym- und/oder höherer Substratkonzentration wiederholt, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Parallel wird immer eine Blindprobe ohne die entsprechende Sialinsäure angesetzt und auf die Entstehung von Phosphat hin untersucht.

2. Chemische und enzymatische Synthesen

2.1. Geräte und Reagenzien

NMR-Spektroskopie

^1H -NMR: 300 MHz Varian VXR 300
300 MHz Varian Gemini 300
500 MHz Varian Unity 500
 ^{13}C -NMR: 75.4 MHz Varian VXR 300
75.4 MHz Varian Gemini 300

Als interner Standard wird für die Messungen in D_2O Natrium-3-trimethylsilyl-[D_4]-propionat, in allen nicht wässrigen Lösungsmitteln Tetramethylsilan verwendet. Sämtliche NMR-Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zuordnung erfolgten anhand von Vergleichsspektren, Literaturangaben sowie 2D-Experimenten (^1H , ^1H - und ^1H , ^{13}C -COSY)

Massenspektren

Finnigan MAT 212, EI 70 eV
Finnigan MAT 95

Ozonisator

Ozon-Generator Modell 502, Fa. Fischer

Zentrifuge

GLC-1 mit Rotor HL-4, Fa. Sorvall

Gefriertrocknung

Lyovac GT 2, Steris

Säulenchromatographie

MN Kieselgel 60, Korngröße 63-200 μm , Fa. Machery & Nagel
Rapid Kieselgel, Korngröße 40-63 μm , Fa. Machery & Nagel
BioGel P-2 Fine, Korngröße 65 ± 20 μm , Bio-Rad

Ionenaustauschchromatographie

Kationenaustauscher: Dowex 50 WX8 (100-200 mesh), pract., H^+ -Form, Fa. Serva
AG 50W-X8 (100-200 mesh), analyt., H^+ -Form, Fa. Bio-Rad

Anionenaustauscher: Dowex 1X8 (100-200 mesh), pract., HCO_3^- -Form, Fa. Serva
AG 1-X8 (100-200 mesh), analyt., HCO_3^- -Form, Fa. Bio-Rad
AG 1-X8 (100-200 mesh), analyt., Formiat-Form, Fa. Bio-Rad

Dünnschichtchromatographie

DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (0.2 mm), Merck

Detektion durch

- UV-Absorption bei 254 nm
- Fluoreszenz-Anregung bei 366 nm
- Benetzen mit Anisaldehydreagenz (200 ml Ethanol, 5.5 ml Anisaldehyd, 7.5 ml H_2SO_4 , 2.2 ml Essigsäure) und anschließendes Erhitzen im Heißluftstrom
- Benetzen mit Permanganat-Lösung (0.5% Kaliumpermanganat in Wasser)

Allgemeiner Arbeitshinweis

Die Badtemperatur der Rotationsverdampfer beträgt bei empfindlichen Verbindungen maximal 25°C, die Kühlung wird auf -15°C eingestellt. Mit diesen Maßnahmen ist in Verbindung mit einer dreistufigen Membranpumpe eine schnelle und schonende Möglichkeit gegeben, Wasser als Lösungsmittel zu entfernen.

Verwendete Enzyme

EC 2.4.99.1	α -2,6-Sialyltransferase aus Rattenleber	α -2,6-SiaT
EC 2.7.7.43	CMP-Sialat-Synthetase aus <i>Neisseria meningitidis</i>	
EC 3.1.3.1	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	CIAP
EC 3.6.1.1	anorganische Phosphatase	Ppase

2.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften

Um den Verlust an Enzym durch Anhaften an der Gefäßwand möglichst gering zu halten, werden die in **AAV 8,9** beschriebenen enzymatischen Reaktionen nicht in Glas-, sondern in verschließbaren Kunststoffgefäßen angesetzt. Weiterhin wird generell etwas NaN_3 zugesetzt, um die Gefahr des Bewachsens mit Mikroorganismen während der Inkubationszeit möglichst auszuschließen. Zum besseren Durchmischen der Enzym-Ansätze werden sie entweder bei Raumtemperatur auf einem Schüttler oder im Thermomixer inkubiert.

AAV 1: Indium-vermittelte Allylierung von Aldehyden

Eine Lösung des Aldehyds in einem Gemisch aus Ethanol / 0.1 M HCl_{aq} (5/1) wird mit Ethyl-2-(brommethyl)-acrylat (2-6 Äquivalente) versetzt. Zu dieser Lösung gibt man portionsweise 2-4 Äquivalente Indimpulver und rührt heftig bei Raumtemperatur bis eine DC-Kontrolle vollständigen Umsatz des eingesetzten Aldehyden anzeigt (2-48 h).

- a.) Aufarbeitung wasserlöslicher Produkte: Der Reaktionsansatz wird mit 0.1 M NaOH vorsichtig auf pH 7.0 eingestellt, mit Phosphatpuffer (1.0 M KH_2PO_4 , 1.3 M K_2HPO_4 , pH 7.0; 1.2 Äquivalente, in Bezug auf die eingesetzte Indiummenge) versetzt und bei Raumtemperatur von ausgefallenen Indiumsalzen abzentrifugiert. Das Zentrifugat wird durch Filtration über Ionenaustauscher (1. HCO_3^- 2. H^+ Form) entsalzt und im Vakuum eingengt. Der verbleibende Rückstand wird entweder im HV getrocknet oder in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.
- b.) Aufarbeitung schlecht wasserlöslicher Produkte: Der Reaktionsansatz wird mit Wasser verdünnt, über Kieselgur filtriert und im Vakuum bis zu einer milchig-trüben Suspension eingengt. Die zurückbleibende wässrige Phase wird dreimal mit gleichen Mengen Methylenchlorid (bei Bedarf Essigester) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt.

AAV 2: Acetylierung

Der zu acetylierende Alkohol wird pro mmol Hydroxyfunktion in 5 ml absolutem Pyridin und 2 g Essigsäureanhydrid gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz entfernt man das Lösungsmittel, nimmt den Rückstand in Essigester auf, filtriert über Kieselgel und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Bei Bedarf kann der so erhaltene sirupöse Rückstand an Kieselgel chromatographiert werden.

AAV 3: Ozonolyse

In eine Lösung des Olefins in wenig trockenem Methanol wird bei -78°C Ozon eingeleitet. Nach dem Auftreten einer Blaufärbung wird für weitere 2 Minuten Ozon durch die Lösung geleitet und anschließend überschüssiges Ozon durch Einleiten von Sauerstoff ausgetrieben. Die Ozonolyse-Lösung wird durch Zugabe von Dimethylsulfid (0.5 ml/mmol) reduktiv aufgearbeitet, langsam auf Raumtemperatur erwärmt und so lange gerührt, bis eine DC-Kontrolle die vollständige Zersetzung des Ozonids anzeigt (2-18 h). Die Lösung wird anschließend im Vakuum eingengt, mehrfach in Wasser aufgenommen und wieder eingengt, um den bei der Ozonolyse entstandenen Formaldehyd bzw. Benzaldehyd vollständig zu entfernen.

AAV 4: Hydrolyse

Der zu hydrolysierende Ester wird pro mmol in 15 ml eines 2:1-Gemisches von Methanol und Wasser gelöst und mit 2-6 Äquivalenten wässriger LiOH-Lösung (0.5 M) versetzt. Nach vollständiger Reaktion wird die Lösung mit H^{+} -Tauscher versetzt und nach 10 Minuten abfiltriert. Bei Bedarf wird die so erhaltene Lösung vorsichtig mit LiOH neutralisiert (pH 7) und im Vakuum eingengt.

AAV 5: Reduktion von Aziden

Eine Lösung der Azidoverbindung in THF wird langsam mit 1.1 Äquivalenten Triphenylphosphin (in THF), 2 Äquivalenten Wasser sowie einigen Siedesteinen versetzt. Der Reaktionsansatz wird bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis DC-Kontrolle vollständigen Umsatz anzeigt (24-96 h). Flüchtige Anteile werden im Vakuum entfernt und das erhaltene Amin-Triphenylphosphinoxid-Gemisch im Falle empfindlicher Verbindungen direkt in die nächste Stufe eingesetzt. Chemisch inerte Amine werden in Diethylether aufgenommen und dreimal mit 5% HCl_{aq} aus der organischen Phase extrahiert. Die wässrigen Extrakte werden mit 1 M Natronlauge auf pH 13 eingestellt, bis sich ein farbloser Niederschlag bildet, mit Methylenchlorid reextrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Bei Bedarf kann das Amin durch Kristallisation aus Diethylether weiter aufgereinigt werden.

AVV 6: N-Derivatisierung von Aminoaldehyden

- a.) NHAc: 1 Äquivalent Amin wird in trockenem Pyridin gelöst und unter Rühren mit Acetanhydrid (1 ml/mmol) versetzt. Der Reaktionsansatz wird anschließend solange gerührt bis dünnschichtchromatographisch ein vollständiger Umsatz zu beobachten ist. Flüchtige Anteile werden im Vakuum entfernt und der verbleibende Sirup durch Flashchromatographie an Kieselgel weiter gereinigt. Im Falle von Aminoalkoholen werden vorab ebenfalls acetylierte Alkoholfunktionen selektiv nach Zemplén geschützt (vgl. AAV 7).
- b.) NHAcPh bzw. NHTrt: Zu einer Lösung von 1 Äquivalent Amin in absolutem Methanol werden unter Rühren 1 Äquivalent Triethylamin und 1.2 Äquivalente Phenyllessigsäurechlorid bzw. Tritylchlorid zugetropft - bei Einsatz von Amin-Hydrochloriden werden zusätzlich 1.1 Äquivalente Natriummethanolat hinzugegeben. Nach 2-4 stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand an Kieselgel chromatographiert und das gewünschte Amin-Derivat als farbloser Feststoff erhalten.

c.) NHFMoc bzw. NHCbz: 1 Äquivalent Amin wird in Dioxan und 10% Natriumcarbonat-Lösung gelöst und unter Rühren und Eiskühlung tropfenweise mit 1.1 Äquivalenten des entsprechenden, in Dioxan gelösten Chlorocarbonats versetzt. Nach 0.5-1 h Reaktionszeit zeigt DC-Kontrolle vollständigen Umsatz an. Der Reaktionsansatz wird im Vakuum eingeeengt und das Produkt durch Chromatographie an Kieselgel aufgereinigt.

AVV 7: Entschüttung nach Zemplén

Eine 0.1 M Lösung der peracetylierten Verbindung in Methanol wird mit Natriummethanolat (50 mg/100 ml) versetzt. Nach Ablauf der Reaktion (0.5-5 h) wird saurer Ionenaustauscher (2 g/100 ml) zugegeben, gerührt, nach wenigen Minuten filtriert und das Produkt bei Bedarf durch Kristallisation oder Chromatographie gereinigt.

AAV 8: Enzymatische Synthese von CMP-Sialinsäuren

Alle enzymatischen Synthesen mit der CMP-Sialat-Synthetase werden in 50 mM Tris-Puffer (pH 8.5) durchgeführt, dem 50 mM MgCl_2 und 0.2 mM Dithiothreitol zugesetzt sind. Zu dem Puffer werden CTP und eine äquimolare Menge der entsprechenden Sialinsäure gegeben. Der pH-Wert wird überprüft und bei Bedarf mit 2 M Natronlauge auf pH 8.5 eingestellt. Anschließend werden die anorganische Pyrophosphatase und CMP-Sialat-Synthetase zugesetzt und der Ansatz für mehrere Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Bei schlechter reagierenden Substraten wird die angegebene Menge an CTP nicht komplett zu Beginn der Reaktion, sondern in 3 Portionen über einen Zeitraum von mehreren Stunden zugegeben. Der pH-Wert des Reaktionsansatzes wird durch Zugabe von Natronlauge (2 M) konstant bei 8.5 gehalten und der Verlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt. Die als schwerlösliches Magnesium-Ammonium-Phosphat dem Reaktionsgemisch entzogenen Magnesiumionen müssen 1-2 Mal nachdosiert werden (1.6 M MgCl_2 -Stammlösung), um die Enzymaktivität aufrecht zu erhalten. Ist ein vollständiger Umsatz erreicht (2-8 h) wird der gebildete Phosphatniederschlag über einen Membranfilter (Porengröße: 0.2 μm) abfiltriert, das Produkt durch Zugabe von Ethanol (9:1, v/v) bei -20°C ausgefällt, 10 Minuten bei 10,000 g abzentrifugiert und im Vakuum getrocknet. Eine weitere Aufreinigung erreicht man bei

Bedarf entweder durch wiederholte fraktionierende Ethanolfällung oder durch Chromatographie an Biogel P-2. Abschließend wird der verbleibende farblose Feststoff in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

AAV 9: Sialyltransfer

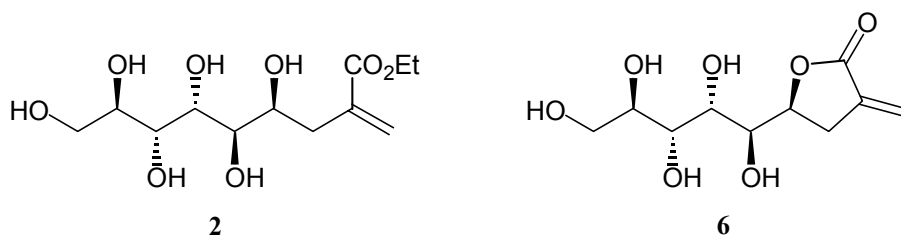
Zu 2 ml Natriumcacodylat-Puffer (50 mM, pH 7.8) werden 30-40 μmol der entsprechenden CMP-Neuraminsäure, 26 μmol LacNAc, 5 μmol MnCl_2 (25 μl einer 0.2 M Stammlösung), 15 μmol NaN_3 (15 μl einer 1 M Stammlösung), ca. 2 mg BSA, 23-35 mU α -2,6-Sialyltransferase und 15 U alkalische Phosphatase gegeben. Die angegebenen Mengen an Zuckernucleotid und Enzymen werden jedoch nicht gleich zu Beginn der Reaktion komplett, sondern in 2-3 Portionen unterteilt über einen Zeitraum von 2-5-Tagen zugesetzt. Der durch das bei der Reaktion entstehende Phosphat immer wieder abfallende pH-Wert wird durch Zutropfen von verdünnter Natronlauge (0.5 M) auf einem konstanten Wert von pH 7.8 gehalten. Durch Verdünnen mit einem weiteren Milliliter Puffer kann das Gleichgewicht einer Reaktion, bei der dünnschichtchromatographisch keine weitere Umsetzung mehr zu beobachten ist, zugunsten der Produktbildung verschoben werden. Ist auch mit dieser Verdünnung kein vollständiger Umsatz des Akzeptorsubstrates zu erreichen, wird die Reaktion spätestens nach 10 Tagen abgebrochen.

Zur Aufarbeitung des Ansatzes werden die Enzyme und ausgefallenes Phosphat durch Membranfiltration (Porengröße: 0.2 μm) entfernt. Das Filtrat wird am Rotationsverampfer bis zur Trockne eingengt, der verbleibende Feststoff in 0.5-1 ml Wasser aufgenommen und über eine Biogel P-2-Säule (50 * 3 cm) chromatographiert. Die Produktfraktionen werden mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie detektiert und erneut eingengt.

2.3. Synthesen

2.3.1. Ethyl-2,3-didesoxy-2-methylen-D-glycero-D-galacto-nononat (2)

2,3-Didesoxy-2-methylen-D-glycero-D-galacto-nononsäure-1,4-lacton (6)



Indium-vermittelte Allylierung von D-Mannose nach **AAV 1a**.

Ansatz: 0.90 g (5.0 mmol) D-Mannose
3.86 g (20.0 mmol) Ethyl-2-(bromomethyl)-acrylat
1.72 g (15.0 mmol) Indium
in 50 ml Ethanol, 10 ml 0.1 M HCl_{aq}

Ausbeute: 1.15 g (4.3 mmol, 86%) Ester(2)-Lacton(6)-Gemisch (1:1) als farbloser Feststoff

¹H-NMR (300 MHz, D₂O) von **2**: δ = 6.30 (s, 1H, =CH_{2a}), 5.80 (s, 1H, =CH_{2b}), 4.24 (q, 2H, Et), 4.10 (m, 1H, H-4), 3.56-3.95 (m, 6H, H-5,6,7,8,9), 2.60 (s, 1H, H-3a), 2.58 (s, 1H, H-3b), 1.30 (t, 3H, Et).
 J_{Et} = 7.1 Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O) von **2**: δ = 172.07 (C-1), 139.54 (C-2), 131.42 (=CH₂), 73.85 (C-4), 73.34 (C-8), 72.90 (C-5), 72.04 (C-7), 71.21 (C-6), 64.67 (C-9), 63.63 (Et), 38.70 (C-3), 16.02 (Et).

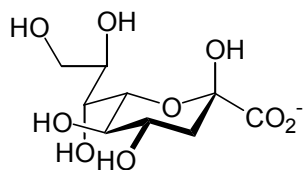
C₁₂H₂₂O₈: 294.30

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O) von **6**: δ = 6.18 (t, 1H, $=\text{CH}_{2\text{a}}$, J = 2.9 Hz), 5.81 (t, 1H, $=\text{CH}_{2\text{b}}$, J = 2.6 Hz), 5.12 (m, 1H, H-4), 3.54-3.98 (m, 6H, H-5,6,7,8,9), 3.17 (m, 1H, H-3a), 2.98 (m, 1H, H-3b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O) von **6**: δ = 176.59 (C-1), 137.16 (C-2), 125.38 ($=\text{CH}_2$), 80.28 (C-4), 73.64 (C-8), 73.52 (C-7), 71.73 (C-6), 71.04 (C-5), 65.95 (C-9), 31.81 (C-3).

$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_7$: 248.23

2.3.2. 3-Desoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonsäure (KDN, **8**)



Ozonolyse von **2/6** nach **AAV 3** und anschließende Hydrolyse des Ozonolyseproduktes nach **AAV 4**.

Ansatz: 535 mg (2.0 mmol) Ester(**2**)-Lacton(**6**)-Gemisch

Ausbeute: 472 mg (1.8 mmol, 88%) **KDN** als farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 4.02 (m, 1H, H-4), 3.98 (dd, 1H, H-6), 3.90 (dd, 1H, H-7), 3.87 (dd, 1H, H-9a), 3.77 (ddd, 1H, H-8), 3.67 (dd, 1H, H-9b), 3.60 (dd, 1H, H-5), 2.27 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.84 (dd, 1H, H-3_{ax}).

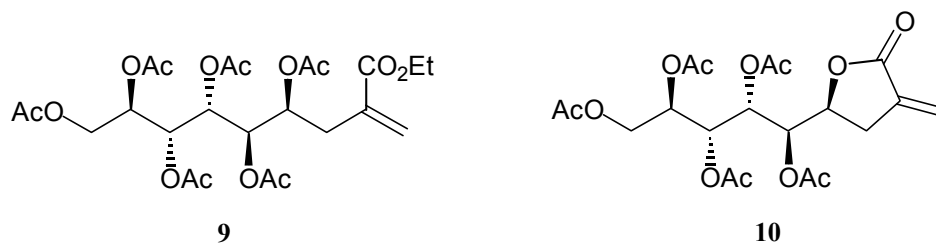
$J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.1$, $J_{3\text{eq},4} = 5.0$, $J_{3\text{ax},4} = 11.8$, $J_{4,5} = 9.6$, $J_{5,6} = 9.6$, $J_{6,7} = 1.1$, $J_{7,8} = 9.1$, $J_{8,9\text{a}} = 2.5$, $J_{8,9\text{b}} = 6.3$ Hz.

^{13}C -NMR (75 MHz, D_2O): δ = 175.65 (C-1), 97.78 (C-2), 74.29 (C-8), 73.03 (C-6), 72.62 (C-5), 71.18 (C-7), 70.47 (C-4), 65.82 (C-9), 41.09 (C-3).

$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_9$: 268.22

2.3.3. Ethyl-4,5,6,7,8,9-hexa-*O*-acetyl-2,3-didesoxy-2-methylen-D-glycero-D-galacto-nononat (**9**)

5,6,7,8,9-Penta-*O*-acetyl-2,3-didesoxy-2-methylen-D-glycero-D-galacto-nononsäure-1,4-lacton (**10**)



Acetylierung von **2/6** nach **AAV 2**.

Ansatz: 535 mg (2.0 mmol) Ester(**2**)-Lacton(**6**)-Gemisch

Ausbeute: 436 mg (0.80 mmol, 80%) **9** als farbloser Feststoff

357 mg (0.78 mmol, 78%) **10** als farbloser Feststoff

nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 3:2)

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) von **9**: δ = 6.13 (s, 1H, $=\text{CH}_{2a}$), 5.53 (s, 1H, $=\text{CH}_{2b}$), 5.45 (dd, 1H, H-6), 5.34 (dd, 1H, H-7), 5.26 (m, 1H, H-4), 5.20 (dd, 1H, H-5), 4.99 (m, 1H, H-8), 4.21 (q, 2H, Et), 4.11 (m, 1H, H-9a), 4.03 (dd, 1H, H-9b), 2.64 (d, 1H, H-3a), 2.62 (d, 1H, H-3b), 2.15, 2.10, 2.06, 2.04, 2.03, 1.98 (6s, 18H, Ac), 1.31 (t, 3H, Et)
 $J_{5,6} = 9.8$, $J_{5,7} = 2.0$, $J_{6,7} = 8.8$, $J_{\text{Et}} = 7.1$ Hz.

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) von **9**: δ = 170.52, 170.20, 170.08, 169.97, 169.92, 169.66 (6 x Ac), 166.10 (C-1), 136.19 (C-2), 127.39 ($=\text{CH}_2$), 69.67 (C-4), 68.51 (C-8), 68.20 (C-5), 67.49 (C-7), 67.01 (C-6), 61.91 (C-9), 60.84 (Et), 35.02 (C-3), 20.92, 20.80, 20.78, 20.70, 20.67, 20.59 (6 x Ac), 14.17 (Et).

MS (ESI, m/z (%)): 546 (9) $[\text{M}]^+$, 501 (1) $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^+$, 487 (42) $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2]^+$

$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_{14}$: 546.54

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) von **10**: δ = 6.17 (m, 1H, $=\text{CH}_{2a}$), 5.65 (dd, 1H, H-6), 5.61 (m, 1H, $=\text{CH}_{2b}$), 5.35 (dd, 1H, H-7), 5.09 (dd, 1H, H-5), 5.07 (m, 1H, H-8), 4.60 (m, 1H, H-4), 4.20 (m, 1H, H-9a), 4.00 (dd, 1H, H-9b), 3.03 (m, 1H, H-3a), 2.78 (m, 1H, H-3b), 2.13, 2.09, 2.07, 2.04, 1.99 (5 x Ac).

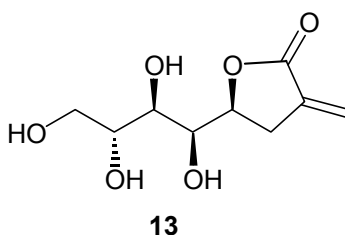
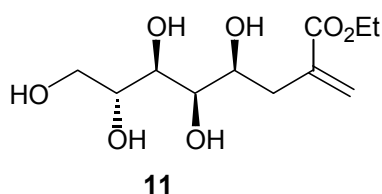
^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) von **10**: δ = 170.52, 170.44, 170.01, 169.85, 169.45 (5 x Ac), 169.24 (C-1), 133.48 (C-2), 121.43 ($=\text{CH}_2$), 73.43 (C-4), 69.97 (C-8), 67.66 (C-7), 67.54 (C-6), 67.36 (C-5), 61.80 (C-9), 29.88 (C-3), 20.91, 3 x 20.64, 20.55 (5 x Ac).

MS (ESI, m/z (%)): 459 (3) $[\text{M}]^+$, 398 (9) $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$

$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$: 458.43

2.3.4. Ethyl-2,3-didesoxy-2-methylen-D-gluc-octonat (**11**)

2,3-Didesoxy-2-methylen-D-gluc-octonsäure-1,4-lacton (**13**)



Indium-vermittelte Allylierung von D-Arabinose nach **AAV 1a**.

Ansatz: 0.45 g (3.0 mmol) D-Arabinose
2.32 g (12.0 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)acrylat
1.38 g (12.0 mmol) Indium
in 35 ml Ethanol, 5 ml 0.1 M HCl_{aq}

Ausbeute: 595 mg (2.25 mmol, 75%) Ester(**11**)-Lacton(**13**)-Gemisch (1:1) als farbloser Feststoff

¹H-NMR (300 MHz, D₂O) von **11**: δ = 6.31 (s, 1H, =CH_{2a}), 5.80 (s, 1H, =CH_{2b}), 4.25 (q, 2H, Et), 3.64-3.94 (m, 6H, H-4,5,6,7,8), 2.69 (dd, 1H, H-3a), 2.43 (dd, 1H, H-3b), 1.31 (t, 3H, Et).
 $J_{3a,3b} = 14.1$, $J_{3a,4} = 3.6$, $J_{3b,4} = 9.4$, $J_{Et} = 7.1$ Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O) von **11**: δ = 172.08 (C-1), 139.84 (C-2), 131.79 (=CH₂), 74.55, 74.10, 73.85, 73.47 (C-4,5,6,7), 65.49 (C-8), 64.74 (Et), 38.29 (C-3), 16.15 (Et).

C₁₁H₂₀O₇: 264.27

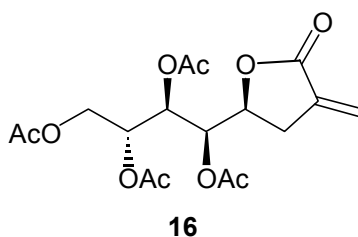
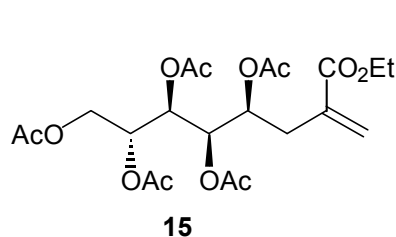
¹H-NMR (300 MHz, D₂O) von **13**: δ = 6.22 (t, 1H, =CH_{2a}, $J = 2.9$ Hz), 5.86 (t, 1H, =CH_{2b}, $J = 2.6$ Hz), 4.84 (m, 1H, H-4), 3.64-3.94 (m, 5H, H-5,6,7,8), 3.17 (m, 1H, H-3a), 2.84 (m, 1H, H-3b).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O) von **13**: δ = 176.24 (C-1), 136.63 (C-2), 126.29 (=CH₂), 82.99 (C-4), 74.70, 73.50, 72.83 (C-5,6,7), 65.68 (C-8), 32.26 (C-3).

C₉H₁₄O₆: 218.20

2.3.5. Ethyl-4,5,6,7,8-penta-*O*-acetyl-2,3-didesoxy-2-methylen-D-*gluco*-octonat (**15**)

5,6,7,8-Tetra-*O*-acetyl-2,3-didesoxy-2-methylen-D-*gluco*-octonsäure-1,4-lacton (**16**)



Acetylierung von **11/13** nach **AAV 2**.

Ansatz: 400 mg (1.65 mmol) Ester(**11**)-Lacton(**13**)-Gemisch

Ausbeute: 310 mg (0.65 mmol, 79%) **15** als farbloser Feststoff

270 mg (0.69 mmol, 84%) **16** als farbloser Feststoff

nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 3:2)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) von **15**: δ = 6.17 (s, 1H, $=\text{CH}_{2a}$), 5.60 (s, 1H, $=\text{CH}_{2b}$), 5.49 (dd, 1H, H-6), 5.33 (m, 1H, H-5), 5.31 (m, 1H, H-4), 5.08 (m, 1H, H-7), 4.24 (m, 1H, H-8a), 4.22 (q, 2H, Et), 4.12 (dd, 1H, H-8b), 2.74 (dd, 1H, H-3a), 2.37 (m, 1H, H-3b), 2.19, 2.09, 2.07, 2.05, 1.99 (5s, 15H, Ac), 1.30 (t, 3H, Et)
 $J_{3a,3b} = 14.1$, $J_{3a,4} = 2.0$, $J_{\text{Et}} = 7.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) von **15**: δ = 170.55, 170.08, 169.97, 169.92, 169.81 (5 x Ac), 165.93 (C-1), 135.72 (C-2), 127.69 ($=\text{CH}_2$), 71.12, 70.09, 68.59, 68.56 (C-4,5,6,7) 61.52 (C-8), 60.88 (Et), 34.07 (C-3), 20.77, 20.74, 20.70, 20.68, 20.57 (5 x Ac), 14.16 (Et).

MS (FAB, m/z (%)): 475 (11) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 415 (100) $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$

$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_{12}$: 474.46

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) von **16**: δ = 6.21 (m, 1H, $=\text{CH}_{2a}$), 5.64 (m, 1H, $=\text{CH}_{2b}$), 5.48 (dd, 1H, H-6), 5.26 (dd, 1H, H-7), 5.09 (m, 1H, H-5), 4.65 (m, 1H, H-4), 4.26 (dd, 1H, H-8a), 4.18 (dd, 1H, H-8b), 3.07 (m, 1H, H-3a), 2.73 (m, 1H, H-3b), 2.18, 2.09, 2.07, 2.04 (4 x Ac).

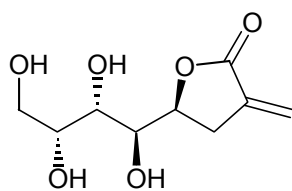
$J_{7,8a} = 2.4$, $J_{7,8b} = 4.2$, $J_{8a,8b} = 12.7$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) von **16**: δ = 170.52, 170.30, 170.21, 169.75 (4 x Ac), 169.04 (C-1), 133.08 (C-2), 122.13 ($=\text{CH}_2$), 75.38 (C-4), 70.84, 68.41, 67.96 (C-5,6,7), 61.50 (C-8), 30.57 (C-3), 20.85, 20.81, 20.67, 20.46 (4 x Ac).

MS (FAB, m/z (%)): 387 (44) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 327 (76) $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$

$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$: 386.35

2.3.6. 2,3-Didesoxy-2-methylen-D-galacto-octulosonsäure-1,4-lacton (17)



Indium-vermittelte Allylierung von D-Lyxose nach AAV 1a

Ansatz: 300 mg (2.0 mmol) D-Lyxose
772 mg (4.0 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)acrylat
460 mg (4.0 mmol) Indium
in 20 ml Ethanol, 4 ml 0.1 M HCl_{aq}

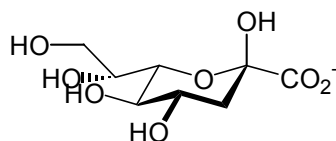
Ausbeute: 320 mg (1.47 mmol, 73%) **17** als farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 6.22 (d, 1H, $=\text{CH}_{2a}$), 5.85 (d, 1H, $=\text{CH}_{2b}$), 5.12 (m, 1H, H-4), 3.62-3.97 (m, 5H, H-5,6,7,8), 3.22 (m, 1H, H-3a), 3.02 (m, 1H, H-3b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ = 176.51 (C-1), 137.07 (C-2), 125.31 ($=\text{CH}_2$), 81.10 (C-4), 73.55 (C-7), 72.54, 72.08 (C-5,6), 65.71 (C-8), 31.70 (C-3).

$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_6$: 218.20

2.3.7. 3-Desoxy-D-galacto-octulosonsäure (4,6-bisepi-KDO; **18**)



Ozonolyse von **17** nach **AAV 3** und anschließende Hydrolyse des Ozonolyseproduktes nach **AAV 4**.

Ansatz: 220 mg (1.0 mmol) Lacton **17**

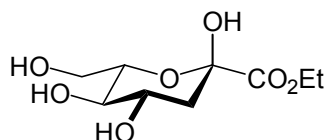
Ausbeute: 210 mg (0.88 mmol, 88%) **18** als farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 3.90-4.06 (m, 2H, H-4,7), 3.58-3.70 (m, 4H, H-5,6,8), 2.18 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.77 (dd, 1H, H-3_{ax}).
 $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.9$, $J_{3\text{eq},4} = 5.1$, $J_{3\text{ax},4} = 11.9$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ = 179.74 (C-1), 99.24 (C-2), 75.34 (C-7), 73.30 (C-6), 71.74 (C-5), 71.43 (C-4), 65.89 (C-8), 41.99 (C-3).

$C_8H_{14}O_8$: 238.19

2.3.8. Ethyl-3-desoxy-D-*arabino*-hept-2-ulopyranosid (19)



Indium-vermittelte Allylierung von D-Erythrose nach **AAV 1a** gefolgt von Ozonolyse nach **AAV 3**.

Ansatz: 0.36 g (3.0 mmol) D-Erythrose
1.16 g (6.0 mmol) Ethyl-2-(bromomethyl)-acrylat
0.69 g (6.0 mmol) Indium
in 25 ml Ethanol, 5 ml 0.1 M HCl_{aq}

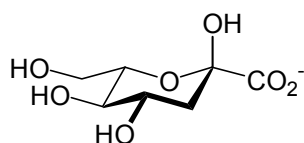
Ausbeute: 505 mg (2.1 mmol, 71% **19** + ca. 5% 3-Desoxy-D-*arabino*-hept-2-ulosonsäure-1,4-lacton) als schwach gelber Sirup

1H -NMR (300 MHz, D_2O): δ = 4.27 (q, 2H, Et), 3.65-3.98 (m, 5H, H-4,5,6,7), 2.29 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.83 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.29 (t, 3H, Et).
 $J_{3eq,3ax}$ = 13.1, $J_{3eq,4}$ = 5.0, $J_{3ax,4}$ = 11.8, J_{Et} = 7.1 Hz.

^{13}C -NMR (75 MHz, D_2O): δ = 175.51 (C-1), 97.61 (C-2), 76.57 (C-6), 72.39 (C-5), 70.97 (C-4), 65.44 (Et), 63.17 (C-7), 41.22 (C-3), 14.88 (Et).

$C_9H_{16}O_7$: 236.22

2.3.9. 3-Desoxy-D-*arabino*-heptulosonsäure (20)



Hydrolyse von **19** nach AAV 3.

Ansatz: 240 mg (1.0 mmol) **19**

Ausbeute: 200 mg (0.96 mmol, 96%) **20** als farbloser Sirup

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 3.62-3.98 (m, 5H, H-4,5,6,7), 2.28 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.83 (dd, 1H, H-3_{ax}).

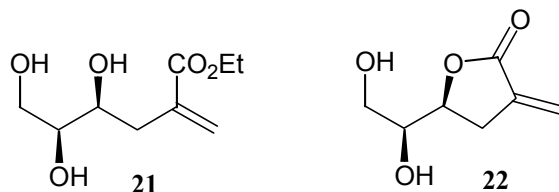
$J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.0$, $J_{3\text{eq},4} = 5.1$, $J_{3\text{ax},4} = 11.6$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ = 175.57 (C-1), 97.68 (C-2), 76.65 (C-6), 73.21 (C-5), 70.96 (C-4), 63.24 (C-7), 41.52 (C-3).

$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_7$: 208.17

2.3.10. Ethyl-2,3-didesoxy-2-methylen-L-*threo*-hexulosonat (21)

2,3-Didesoxy-2-methylen-L-*threo*-hexulosonsäure-1,4-lacton (22)



Indium-vermittelte Allylierung von L-Glycerinaldehyd nach AAV 1a.

Ansatz: 0.27 g (3.0 mmol) L-Glycerinaldehyd
1.16 g (6.0 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)-acrylat
0.69 g (6.0 mmol) Indium
in 25 ml Ethanol, 5 ml 0.1 M HCl_{aq}

Ausbeute: 370 mg (1.8 mmol, 60%, de 85%) **21** als farbloser Sirup
112 mg (0.7 mmol, 23%, de 85%) **22** als farbloser Sirup.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O) von **21**: δ = 6.29 (s, 1H, =CH_{2a}), 5.78 (s, 1H, =CH_{2b}), 4.24 (q, 2H, Et), 3.60-3.85 (m, 4H, H-4,5,6), 2.62 (dd, 1H, H-3a), 2.47 (dd, 1H, H-3b), 1.30 (t, 3H, Et).
 $J_{3a,3b} = 14.3$, $J_{3a,4} = 4.4$, $J_{3b,4} = 9.1$, $J_{Et} = 7.1$ Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O) von **21**: δ = 171.97 (C-1), 139.35 (C-2), 131.50 (=CH₂), 76.41 (C-5), 72.36 (C-4), 65.43 (C-6), 64.67 (Et), 38.19 (C-3), 16.02 (Et).

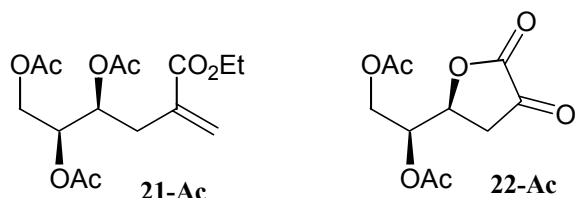
C₉H₁₆O₅: 204.22

¹H-NMR (300 MHz, D₂O) von **22**: δ = 6.18 (t, 1H, =CH_{2a}), 5.82 (t, 1H, =CH_{2b}), 4.78 (m, 1H, H-4), 3.62-3.80 (m, 3H, H-5,6), 3.13 (m, 1H, H-3a), 2.92 (m, 1H, H-3b).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O) von **22**: δ = 176.41 (C-1), 136.88 (C-2), 125.96 (=CH₂), 81.10 (C-4), 75.72 (C-5), 64.91 (C-6), 32.02 (C-3)

C₇H₁₀O₄: 158.15

5,6-Di-*O*-acetyl-2,3-didesoxy-2-methylen-L-*threo*-hexulosonsäure-1,4-lacton (22-Ac)

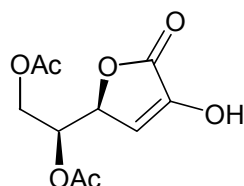


¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) von **22-Ac**: δ = 6.23 (t, 1H, =CH_{2a}), 5.67 (t, 1H, =CH_{2b}), 5.22 (m, 1H, H-5), 4.78 (m, 1H, H-4), 4.37 (dd, 1H, H-6a), 4.20 (dd, 1H, H-6b) 3.10 (m, 1H, H-3a), 2.75 (m, 1H, H-3b), 2.07, 2.06 (2s, 6H, 2xAc)
J_{5,6a} = 4.7, J_{5,6b} = 7.1, J_{6a,6b} = 11.8 Hz.

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) von **22-Ac**: δ = 170.44, 170.22 (2xAc), 169.48 (C-1), 133.27 (C-2), 122.08 ($=\text{CH}_2$), 74.44 (C-4), 71.66 (C-5), 62.24 (C-6), 29.64 (C-3), 20.67, 20.63 (2xAc).

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_6$: 242.23

2.3.12. 5,6-Di-*O*-acetyl-3-desoxy-L-*threo*-hex-2-ulosonsäure-1,4-lacton (**24-Ac**)



Ozonolyse von **22-Ac** nach AAV 3.

Ansatz: 120 mg (0.5 mmol) **22-Ac**
in 15 ml Methanol

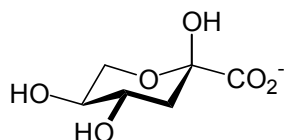
Ausbeute: 120 mg (0.5 mmol, quant.) **24-Ac** (unter NMR-Messbedingungen Keto-Enol-Tautomerie = 1:6)

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) von **24-Ac** (Enol-Form): δ = 6.14 (d, 1H, H-3), 5.26 (dt, 1H, H-5), 5.16 (dd, 1H, H-4), 4.40 (dd, 1H, H-6a), 4.25 (dd, 1H, H-6b), 2.10, 2.08 (2s, 6H, 2xAc)
 $J_{3,4} = 2.1$, $J_{4,5} = 3.9$, $J_{5,6a} = 4.3$, $J_{5,6b} = 6.4$, $J_{6a,6b} = 11.8$ Hz.

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) von **24-Ac** (Enol-Form): δ = 170.80, 170.29 (2xAc), 169.28 (C-1), 143.58 (C-2), 114.47 (C-3), 77.37 (C-4), 69.82 (C-5), 62.41 (C-6), 20.71, 20.67 (2xAc); Keto-Form: 190.73 (C-2), 170.09, 169.92 (2xAc), 167.96 (C-1), 76.94 (C-4), 70.97 (C-5), 61.58 (C-6), 35.71 (C-3), 20.78, 20.44 (2xAc).

$C_{10}H_{12}O_7$: 244.20

2.3.13. 3-Desoxy-L-*threo*-2-hexulosonsäure (**25**)



Indium-vermittelte Allylierung von L-Glycerinaldehyd nach **AAV 1a**, Ozonolyse nach **AAV 3** und anschließende Hydrolyse des Ozonolyseproduktes nach **AAV 4**.

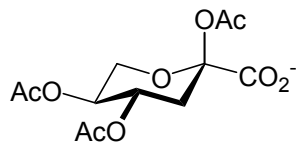
Ansatz: 180 mg (2.0 mmol) L-Glycerinaldehyd
 772 mg (4.0 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)-acrylat
 460 mg (4.0 mmol) Indium
 in 20 ml Ethanol, 4 ml 0.1 M HCl_{aq}

Ausbeute: 270 mg (1.52 mmol, 76%) **25** als schwach gelber Sirup

1H -NMR (300 MHz, D_2O): δ = 3.94-3.60 (m, 4H, H-4,5,6), 2.26 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.81 (dd, 1H, H-3_{ax})
 $J_{3eq,3ax} = 13.2$, $J_{3eq,4} = 4.9$, $J_{3ax,4} = 11.6$ Hz.

^{13}C -NMR (75 MHz, D_2O): δ = 175.83 (C-1), 98.28 (C-2), 73.18, (C-5) 71.23 (C-4), 65.96 (C-6), 41.34 (C-3).

$C_6H_{10}O_6$: 178.14

2.3.14. 2,4,5-Tri-*O*-acetyl-3-desoxy-L-*threo*-2-hexulosonsäure (25-Ac)

Acetylierung von 3-Desoxy-L-*threo*-2-hexulosonsäure **25** nach **AAV 2**.

Ansatz: 89 mg (0.5 mmol) **25**

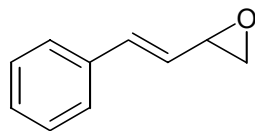
Ausbeute: 135 mg (0.44 mmol, 88%) **25-Ac** als farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.32 (m, 1H, H-5), 5.05 (m, 1H, H-4), 4.06 (dd, 1H, H-6a), 3.63 (t, 1H, H-6b), 2.49 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.17, 2.15, 2.10 (3s, 9H, 3xAc), 1.89 (dd, 1H, H-3_{ax}).

$J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.2$, $J_{3\text{eq},4} = 4.9$, $J_{3\text{ax},4} = 11.6$, $J_{5,6\text{a}} = 5.6$, $J_{6\text{a},6\text{b}} = 11.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 176.75, 176.19, 176.07 (3xAc), 174.62 (C-1), 101.71 (C-2), 72.16 (C-5), 71.73 (C-4), 66.20 (C-6), 38.66 (C-3).

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_9$: 304.25

2.3.15. 1,2-Epoxy-4-phenyl-3-buten (26)

Unter Argonatmosphäre und Feuchtigkeitsausschluss werden 80 ml DMSO sowie 80 ml THF mit 3.84 g (160 mmol) Natriumhydrid versetzt. Der Reaktionsansatz wird auf 0°C gekühlt und innerhalb von 5 min 32.6 g (160 mmol) Trimethylsulfoniumiodid in 110 ml DMSO zugetropft. Anschließend gibt man in einer Portion 6.6 g (50 mmol) Zimtaldehyd zu, rührt 30 min bei 0°C sowie weitere 45 min bei Raumtemperatur. Die Reaktionsmischung wird durch anfänglich vorsichtige Zugabe von insgesamt 300 ml Wasser gequencht und dreimal mit je 200 ml Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je 200 ml Wasser gewaschen über K₂CO₃ getrocknet und im Vakuum eingengt.

Ansatz: 6.6 g (50.0 mmol) Zimtaldehyd

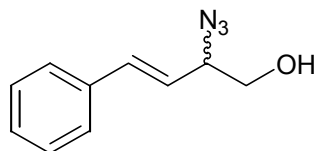
Ausbeute: 6.8 g (93%) **26** als farblose Flüssigkeit nach Destillation im Vakuum (0.1 mbar, 60°C).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.21-7.38 (m, 5H, Ph), 6.79 (d, 1H, H-4), 5.85 (dd, 1H, H-3), 3.49 (m, 1H, H-2), 3.03 (dd, 1H, H-1a), 2.75 (dd, 1H, H-1b).

$J_{3,4} = 16.0$, $J_{2,3} = 8.0$, $J_{1a,2} = 4.1$, $J_{1b,2} = 2.6$, $J_{1a,1b} = 5.2$.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 136.16 (C-ar_i), 134.69 (C-4), 128.78, 128.31, 127.15 (C-ar), 126.61 (C-3), 52.83 (C-2), 49.40 (C-1).

C₁₀H₁₀O: 146.19

2.3.16. 2-Azido-4-phenyl-3-buten-1-ol (27)

In 32 ml Aceton und 16 ml Wasser werden 3.2 g (22 mmol) Epoxid **26** und 2.86 g (44 mmol) Natriumazid gelöst und 2 h gelinde zum Sieden erhitzt. Der Reaktionsansatz wird durch Zugabe von 0.8 g Ammoniumchlorid angesäuert und weitere 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend gibt man 8 ml Wasser zu und entfernt das Aceton im Vakuum. Der wässrige Rückstand wird dreimal mit je 40 ml Methylenchlorid extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Ansatz: 3.2 g (22.0 mmol) 1,2-Epoxy-4-phenyl-3-buten **26**

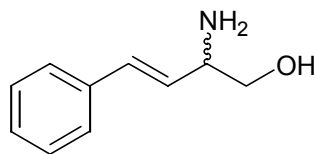
Ausbeute: 3.6 g (87%) **27** als farbloser Feststoff nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 5:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.23-7.42 (m, 5H, Ph), 6.70 (d, 1H, H-4), 6.12 (dd, 1H, H-3), 4.22 (m, 1H, H-2), 3.70 (dd, 1H, H-1a), 3.61 (dd, 1H, H-1b), 2.41 (m, 1H, OH).

$J_{1a,1b} = 11.4$, $J_{1a,2} = 4.4$, $J_{1b,2} = 7.2$, $J_{2,3} = 8.0$, $J_{3,4} = 15.8$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 135.77 (C- ar_i), 135.38 (C-4), 128.85, 128.60, 126.89 (C-ar), 123.06 (C-3), 66.45 (C-2), 65.07 (C-1).

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$: 189.21

2.3.17. 2-Amino-4-phenyl-3-buten-1-ol (29)

Reduktion von 2-Azido-4-phenyl-3-buten-1-ol **27** mit Triphenylphosphin nach **AAV 5**.

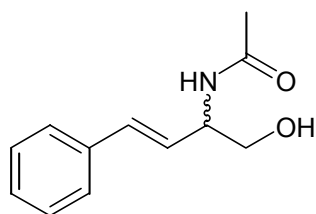
Ansatz: 1.89 g (10.0 mmol) 2-Azido-4-phenyl-3-buten-1-ol **27**
 2.89 g (11.0 mmol) Triphenylphosphin
 0.36 g (20.0 mmol) Wasser
 in 90 ml THF

Ausbeute: 1.16 g (71%) **29** als farblose Kristalle nach Kristallisation aus Diethylether.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.23-7.38 (m, 5H, Ph), 6.53 (d, 1H, H-4), 6.14 (dd, 1H, H-3), 3.67 (m, 2H, H-1), 3.46 (m, 1H, H-2), 2.50 (br s, 3H, OH, NH_2).
 $J_{2,3} = 6.6$, $J_{3,4} = 16.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 136.80 (C- ar_i), 132.13 (C-4), 130.63, 128.72, 127.76 (C-ar), 126.46 (C-3), 66.45 (C-2), 55.55 (C-1).

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}$: 163.22

2.3.18. *N*-Acetyl-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol (34)

Acetylierung von **29** nach AAV 6a.

Ansatz: 815 mg (5.0 mmol) 2-Amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **29**
5.0 ml Acetanhydrid
in 10 ml Pyridin

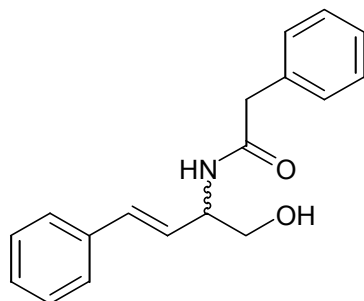
Ausbeute: 900 mg (94%) **34** als farblose Kristalle nach Chromatographie an Kieselgel
(Chloroform : Methanol = 10:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.21-7.39 (m, 5H, Ph), 6.57 (d, 1H, H-4), 6.21 (dd, 1H, H-3), 4.60 (dd, 1H, H-2), 3.62 (m, 1H, H-1), 2.01 (3, 3H, CH_3 Ac).
 $J_{2,3} = 6.3$, $J_{2,\text{NH}} = 5.2$, $J_{3,4} = 16.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 173.12 (C=O, Ac), 138.33 (C- ar_i), 132.85 (C-4), 129.71, 128.77, 127.97 (C-ar), 126.88 (C-3), 65.30 (C-1), 54.91 (C-2), 22.91 (CH_3 , Ac).

$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_2$: 205.25

2.3.19. *N*-Phenylacetyl-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol (**35**)



N-Derivatisierung von 2-Amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **29** nach AAV **6b** mit Phenylelessigsäurechlorid.

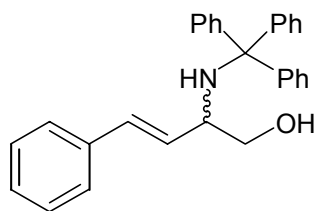
Ansatz: 1.14 g (7.0 mmol) 2-Amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **29**
 1.30 g (8.4 mmol) Phenylelessigsäurechlorid
 2 ml Pyridin
 in 60 ml Methylenchlorid

Ausbeute: 1.65 g (84%) **35** als farblose Kristalle nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 1:1 → 1:2).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.20-7.38 (m, 10H, H-ar), 6.47 (dd, 1H, dd, H-4), 6.22 (dd, 1H, H-3), 4.88 (br s, 1H, NH), 4.60 (m, 1H, H-2), 3.64 (m, 2H, H-1), 3.57 (s, 2H, CH_2).
 $J_{2,3} = 6.0$, $J_{2,4} = 1.2$ Hz, $J_{3,4} = 16.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ = 173.93 (C=O), 138.24, 137.18 (C-ar_i), 132.74 (C-4), 130.52, 130.31, 129.78, 128.79, 128.23, 128.09, 127.57 (C-ar, C-3), 65.26 (C-1), 54.82 (C-2), 44.22 (CH_2).

$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_2$: 281.35

2.3.20. *N*-Trityl-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol (36)

N-Derivatisierung von 2-Amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **29** nach **AAV 6b** mit Tritylchlorid.

Ansatz: 0.82 g (5.0 mmol) 2-Amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **29**
1.67 g (6.0 mmol) Tritylchlorid
0.50 g (5.0 mmol) Triethylamin
in 50 ml Methanol

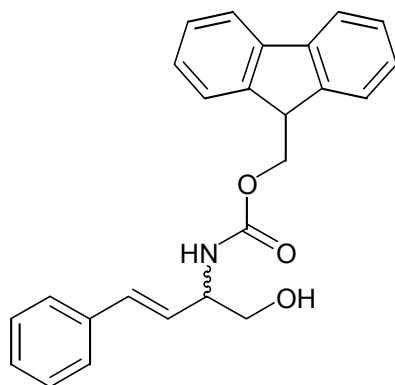
Ausbeute: 1.18 g (58%) **36** als farblose Kristalle nach Chromatographie an Kieselgel
(Cyclohexan : Essigester = 10:1 → 5:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.46-7.49 (m, 6H, H-ar), 7.13-7.20 (m, 10H, H-ar), 7.05-7.09 (m, 4H, H-ar), 6.17 (d, 1H, H-4), 5.68 (dd, 1H, H-3), 3.27 (m, 2H, H-1), 2.86 (m, 1H, H-2), 1.93 (br s, 2H, OH, NH).
 $J_{2,3} = 7.1$, $J_{3,4} = 16.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 146.66 (C-ar_i), 137.12 (C-ar_i), 131.23 (C-4), 130.60, 128.99, 128.50, 128.07, 128.03, 126.70, 126.39 (C-ar, C-3), 71.29 (C-Trt), 65.37 (C-1), 56.88 (C-2).

$\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{NO}$: 405.53

2.3.21. *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol (**37**)



N-Derivatisierung von 2-Amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **29** nach AAV **6c** mit Fmoc-Chlorid.

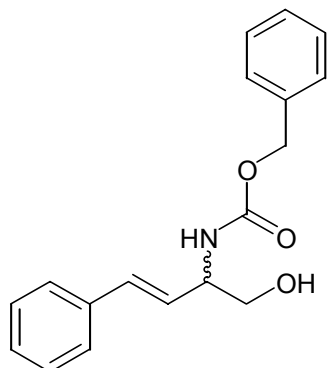
Ansatz: 490 mg (3.0 mmol) 2-Amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **29**
 854 mg (3.3 mmol) Fmoc-Chlorid
 in 15 ml Dioxan und 10 ml 10% Natriumcarbonat-Lsg.

Ausbeute: 1.00 g (87%) **37** als farblose Kristalle nach Chromatographie an Kieselgel
 (Chloroform : Methanol = 20:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.65 (d, 2H, Fmoc-4), 7.51 (d, 2H, Fmoc-1), 7.11-7.29 (m, 9 H, H-ar, Ph, Fmoc-2, Fmoc-3), 6.46 (d, 1H, H-4), 6.07 (dd, 1H, H-3), 4.28-4.38 (m, 3H, H-2, CH_2 Fmoc), 4.12 (m, 1H, Fmoc-9), 3.58 (m, 2H, H-1).
 $J_{2,3} = 6.2$ Hz, $J_{3,4} = 16.0$, $J_{\text{Fmoc}1,2} = 7.1$, $J_{\text{Fmoc}3,4} = 7.3$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 156.78 (C=O Fmoc), 143.86 (Fmoc-8a), 141.29 (Fmoc-4a), 136.53 (C-4), 128.52, 127.69, 127.07, 126.78, 126.44, 125.01 (C-ar, Ph + Fmoc, C-3), 66.70 (CH_2 Fmoc), 64.47 (C-1), 54.87 (C-2), 47.19 (Fmoc-9).

$\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{NO}_3$: 385.46

2.3.22. *N*-Benzyloxycarbonyl-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol (38)

N-Derivatisierung von 2-Amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **29** nach AAV **6c** mit Cbz-Chlorid.

Ansatz: 1.63 g (10.0 mmol) 2-Amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **29**
1.88 g (11.0 mmol) Chlorameisensäurebenzylester
in 40 ml Dioxan und 25 ml 10% Natriumcarbonat-Lsg.

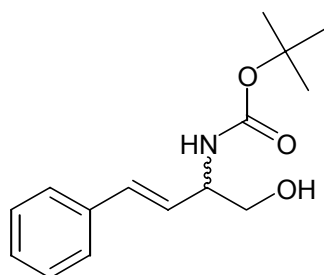
Ausbeute: 2.14 g (72%) **38** als farblose Kristalle nach Chromatographie an Kieselgel
(Cyclohexan : Essigester = 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.25-7.37 (m, 10H, H-ar Ph/Z), 6.56 (d, 1H, H-4), 6.13 (dd, 1H, H-3), 5.38 (m, 1H, H-2), 4.41 (br s, 1H, NH), 4.10 (s, 2H, CH_2 Z), 3.70 (m, 2H, H-1).
 $J_{2,3} = 6.1$ Hz, $J_{3,4} = 16.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 156.54 (C=O Z), 136.38 (C-ar_i, Ph/Z), 132.16 (C-4), 128.70, 128.32, 128.00, 126.62 (C-ar, Ph/Z), 126.45 (C-3), 67.17 (CH_2 , Z), 65.30 (C-1), 55.02 (C-2).

$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_3$: 297.35

2.3.23. *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol (**39**)



N-Derivatisierung von 2-Amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **29** nach **AAV 6b** mit Di-*tert*-butyldicarbonat.

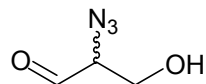
Ansatz: 0.78 g (4.8 mmol) 2-Amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **29**
 1.15 g (5.3 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat
 0.7 ml Triethylamin in 20 ml Methanol

Ausbeute: 960 mg (76%) **39** als farblose Kristalle nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.20-7.38 (m, 5H, H-ar), 6.57 (d, 1H, H-4), 6.14 (dd, 1H, H-3), 5.13 (br s, 1H, NH), 4.38 (m, 1H, H-2), 3.72 (m, 2H, H-1), 1.46 (s, 9H, CH_3 Boc).
 $J_{2,3} = 6.1 \text{ Hz}$, $J_{3,4} = 16.0 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 156.18 (C=O Boc), 136.57 (C-ar_i Ph), 131.84 (C-4), 128.67, 127.86, 126.97 (C-ar), 126.58 (C-3), 80.06 (C-q, Boc), 65.52 (C-1), 54.64 (C-2), 28.51 (CH_3 Boc).

$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_3$: 263.33

2.3.24. 2-Azido-2-desoxy-DL-glycerinaldehyd (28)

Ozonolyse von **27** nach **AAV 3**.

Ansatz: 757 mg (4.0 mmol) 2-Azido-4-phenyl-3-buten-1-ol **27**
in 25 ml Methanol

Ausbeute: 415 mg (3.6 mmol, 90%) **28**

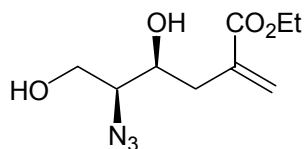
Bei dem Versuch der Reinigung durch Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : MTBE = 3:1 → 1:1) wurden nach partieller Zersetzung des chemisch hochempfindlichen Aldehyds nur heterogen Gemische erhalten. Wie zügige NMR-Messungen des Rohproduktes zeigten, bedarf es jedoch keiner weiteren Aufreinigung des Aldehyden, der in hoher Reinheit bei der Ozonolyse erhalten wird.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O , Aldehyd-Hydrat): δ = 5.04 (d, 1H, H-1), 3.78-3.85 (m, 1H, H-3a), 3.61-3.69 (m, 1H, H-3b), 3.53-3.58 (m, 1H, H-2).
 $J_{1,2}$ = 5.2 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O , Aldehyd-Hydrat): δ = 92.02 (C-1), 70.12 (C-2), 63.55 (C-3).

$\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$: 115.09

2.3.25. Ethyl-2,3,5-tridesoxy-5-azido-2-methylen-DL-*threo*-hexulose (30)



Indium-vermittelte Allylierung von **28** nach AAV **1a**.

Ansatz: 230 mg (2.0 mmol) 2-Azido-2-desoxy-DL-glycerinaldehyd **28**
 772 mg (4.0 mmol) Ethyl-2-(bromomethyl)acrylat
 460 mg (4.0 mmol) Indium
 in 20 ml Ethanol, 4 ml 0.1 M HCl_{aq}

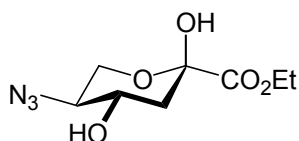
Ausbeute: 335 mg (1.46 mmol, 73%) **30** als farbloser Sirup

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.22 (s, 1H, =CH_{2a}), 5.73 (s, 1H, =CH_{2b}), 4.20 (q, 2H, Et), 3.65-3.90 (m, 3H, H-4,6), 3.30-3.38 (m, 1H, H-5), 2.60 (dd, 1H, H-3a), 2.50 (dd, 1H, H-3b), 1.29 (t, 3H, Et).
 $J_{3a,3b} = 13.7$, $J_{3a,4} = 5.0$, $J_{3b,4} = 8.3$, $J_{Et} = 7.1$ Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 168.57 (C-1), 138.62 (C-2), 128.62 (=CH₂), 70.58 (C-4), 68.52 (C-5), 63.54 (C-6), 62.10 (Et), 38.29 (C-3), 14.64 (Et).

C₉H₁₅N₃O₄: 229.23

2.3.26. Ethyl-3,5-didesoxy-5-azido-DL-*threo*-hex-2-ulopyranosid (31)



Ozonolyse von **30** nach AAV **3**.

Ansatz: 229 mg (1.0 mmol) Ethyl-2,3,5-tridesoxy-5-azido-2-methylen-DL-*threo*-hexulosonat **30**
in 15 ml Methanol

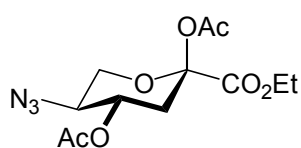
Ausbeute: 200 mg (87%) **31** als farbloser Sirup nach Chromatographie an Kieselgel
(Chloroform : Methanol = 10:1→5:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 4.28 (q, 2H, Et), 3.52-3.97 (m, 4H, H-4,5,6), 2.19 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.00 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.30 (t, 3H, Et).
 $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.9$, $J_{3\text{eq},4} = 5.0$, $J_{3\text{ax},4} = 11.4$, $J_{\text{Et}} = 7.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 169.86 (C-1), 95.91 (C-2), 67.85 (C-5), 64.74 (C-4), 62.55 (C-6), 61.66 (Et), 38.86 (C-3), 13.98 (Et).

$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_5$: 231.21

2.3.27. Ethyl-3,5-didesoxy-2,4-di-*O*-acetyl-5-azido-DL-*threo*-hex-2-ulopyranosat (**31-Ac**)



Acetylierung von **31** nach AAV 2.

Ansatz: 90 mg (0.4 mmol) **31**
in 2 ml Pyridin

Ausbeute: 65 mg (57%) **31-Ac** als farbloser Sirup nach Chromatographie an Kieselgel
(Cyclohexan : Essigester = 1:1).

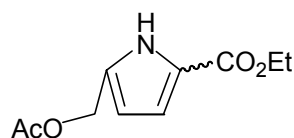
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.20 (m, 1H, H-4), 4.25 (q, 2H, Et), 4.07 (m, 1H, H-6a), 3.75 (m, 1H, H-5), 3.53 (t, 1H, H-6b), 2.64 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.14, 2.12 (s, 6H, 2xAc), 1.82 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.30 (t, 3H, Et).

$J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.3$, $J_{3\text{eq},4} = 5.1$, $J_{3\text{ax},4} = 11.3$, $J_{5,6\text{a}} = 6.0$, $J_{6\text{a},6\text{b}} = 11.3$, $J_{\text{Et}} = 7.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 169.93, 168.50 (2 x Ac), 166.44 (C-1), 96.99 (C-2), 69.78 (C-5), 63.19 (C-6), 62.89 (Et), 58.86 (C-4), 36.13 (C-3), 21.01, 20.77 (2 x Ac), 13.98 (Et).

$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$: 315.28

2.3.28. 5-Acetoxymethyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäureethylester (33)



Eine Lösung der Azidoverbindung in THF wird langsam mit 1.1 Äquivalenten Triphenylphosphin (in THF) und 2 Äquivalenten Wasser versetzt. Der Reaktionsansatz wird bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis DC-Kontrolle vollständigen Umsatz anzeigt (24 h). Das Reaktionsprodukt wird mittels präparativer Dünnschichtchromatographie von Nebenprodukten (Triphenylphosphinoxid) befreit, in 1 ml Pyridin aufgenommen und mit 0.4 ml Acetanhydrid versetzt. Der Reaktionsansatz wird 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, im Vakuum von flüchtigen Bestandteilen befreit und an Kieselgel chromatographiert.

Ansatz: 60 mg (0.26 mmol) **31**
 78 mg (0.30 mmol) PPh_3
 10 μl H_2O
 in 1 ml THF

Ausbeute: 32 mg (58%) **33** schwach gelber Sirup nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.82 (d, 1H, H-3), 6.24 (d, 1H, H-4), 5.05 (s, 2H, H-6), 4.30 (q, 2H, Et), 2.09 (s, 3H, Ac), 1.35 (t, 3H, Et).

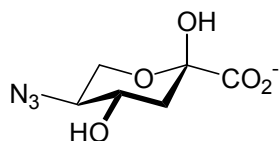
$J_{3,4} = 3.5$, $J_{\text{Et}} = 7.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) von **E**: δ = 171.30 (Ac), 161.05 (C-1), 131.44 (C-5), 124.65 (C-2), 115.26 (C-3), 111.59 (C-4), 60.61 (Et), 58.90 (C-6), 21.04 (Ac), 14.62 (Et).

MS (ESI, m/z (%)): 445.0 (21) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 234.0 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 174.0 (35) $[\text{M}+\text{Na}-\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}]^+$.

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_4$: 211.08

2.3.29. 3,5-Didesoxy-5-azido-DL-threo-2-hexulosonsäure (**50**)



Hydrolyse von **31** nach **AAV 4**.

Ansatz: 200 mg (0.87 mmol) Ethyl-3,5-didesoxy-5-azido-DL-threo-hex-2-ulopyranosat **31**

Ausbeute: 170 mg (97%) **50** als farbloser Sirup.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 3.53-3.96 (m, 4H, H-4,5,6), 2.28 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.86 (dd, 1H, H-3_{ax}).

$J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.1$, $J_{3\text{eq},4} = 5.0$, $J_{3\text{ax},4} = 11.5$ Hz.

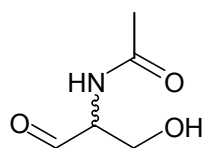
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ = 175.25 (C-1), 98.06 (C-2), 70.14 (C-5), 67.03 (C-4), 64.04 (C-6), 41.43 (C-3).

MS (ESI, m/z (%)): 240 (100) $[M+2H_2O+H]^+$, 217 (51) $[M+2Li]^+$, 215 (85) $[M+2Li-2H]^+$
204 (10) $[M+H]^+$

R_F-Wert: 0.63 [Aceton-1-Butanol-Wasser = 5-4-1]

C₆H₉N₃O₅: 203.15

2.3.30. *N*-Acetyl-2-amino-2-desoxy-DL-glycerinaldehyd (**40**)



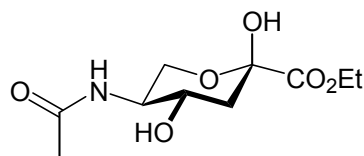
Ozonolyse von **34** nach AAV 3.

Ansatz: 235 mg (1.2 mmol) *N*-Acetyl-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **34**
in 15 ml Methanol

Ausbeute: 160 mg (quant.) **40**

Der hochempfindliche Aldehyd wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

C₅H₉NO₃: 131.13

2.3.31. Ethyl-3,5-dideoxy-5-(acetylamino)-DL-*threo*-hex-2-ulopyranosid (46)

Indium-vermittelte Allylierung von Aldehyd **40** nach **AAV 1a**, gefolgt von Ozonolyse nach **AAV 3**.

Ansatz: 160 mg (1.2 mmol) **40**
463 mg (2.4 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)-acrylat
276 mg (2.4 mmol) Indium
in 15 ml Ethanol, 3 ml 0.1 M HCl_{aq}

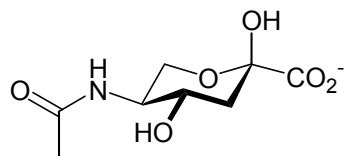
Ausbeute: 205 mg (69%) **46** als farbloser Sirup nach Chromatographie an Kieselgel
(Chloroform : Methanol = 20:1→5:1).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 4.24 (q, 2H, Et), 3.52-3.90 (m, 4H, H-4,5,6), 2.17 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.90 (s, 3H, Ac), 1.72 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.30 (t, 3H, Et).
J_{3eq,3ax} = 13.1, J_{3eq,4} = 4.9, J_{3ax,4} = 11.2, J_{Et} = 7.1 Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 175.00 (Ac), 173.38 (C-1), 96.88 (C-2), 68.24 (C-4), 63.67 (C-6), 61.20 (Et), 54.38 (C-5), 41.43 (C-3), 24.40 (Ac), 13.78 (Et).

C₁₀H₁₃NO₆: 247.19

2.3.32. 3,5-Didesoxy-5-(acetylamino)-DL-*threo*-2-hexulosonsäure (**51**)



Hydrolyse von **46** nach **AAV 4**.

Ansatz: 205 mg (0.83 mmol) Ethyl-3,5-didesoxy-5-(acetylamino)-DL-*threo*-hex-2-ulo-pyranosat **46**

Ausbeute: 170 mg (93%) **51** als farbloser Sirup.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 3.82 (m, 1H, H-4), 3.67 (m, 2H, H-6), 3.53 (m, 1H, H-5), 2.15 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.90 (s, 3H, Ac), 1.69 (dd, 1H, H-3_{ax}).

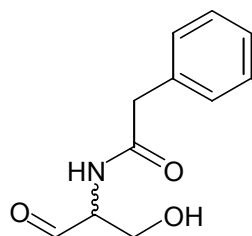
$J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.1$, $J_{3\text{eq},4} = 4.9$, $J_{3\text{ax},4} = 11.2$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ = 177.23 (C-1), 175.07 (Ac), 97.75 (C-2), 68.27 (C-4), 63.67 (C-6), 54.36 (C-5), 41.33 (C-3), 24.40 (Ac).

MS (ESI, m/z (%)): 437.0 (26) $[2\text{M-H}]^-$, 218 (100) $[\text{M-H}]^-$

R_f -Wert: 0.66 [Aceton-1-Butanol-Wasser = 5-4-1]

$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_6$: 219.19

2.3.33 *N*-Phenylacetyl-2-amino-2-desoxy-DL-glycerinaldehyd (41)

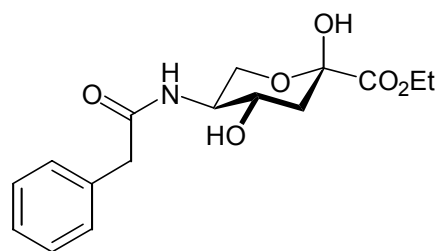
Ozonolyse von **35** nach **AAV 3**.

Ansatz: 560 mg (2.0 mmol) *N*-Phenylacetyl-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **35**
in 20 ml Methanol

Ausbeute: 420 mg (quant.) **41**

Der hochempfindliche Aldehyd wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

$C_{11}H_{13}NO_3$: 207.23

2.3.34. Ethyl-3,5-didesoxy-5-(phenylacetylamino)-DL-threo-hex-2-ulopyranosid (47)

Indium-vermittelte Allylierung von Aldehyd **41** nach AAV **1b**, gefolgt von Ozonolyse nach AAV **3**.

Ansatz: 420 mg (2.0 mmol) *N*-Phenylacetyl-2-amino-2-desoxy-DL-glycerinaldehyd **41**
 772 mg (4.0 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)-acrylat
 460 mg (4.0 mmol) Indium
 in 20 ml Ethanol, 4 ml 0.1 M HCl_{aq}

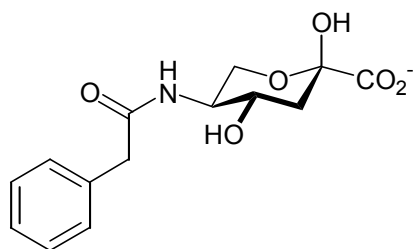
Ausbeute: 435 mg (67%) **47** als farbloser Sirup nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol = 20:1→10:1).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 7.16-7.26 (m, 5H, H-ar), 4.16 (q, 2H, Et), 3.51 (s, 2H, CH₂ Bn), 3.46-3.94 (m, 4H, H-4,5,6), 2.12 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.86 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.22 (t, 3H, Et).
 $J_{3eq,3ax} = 12.9$, $J_{3eq,4} = 5.0$, $J_{3ax,4} = 11.4$, $J_{Et} = 7.1$ Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 172.72 (C=O, PhAc), 170.08 (C-1), 135.20 (C-ar_i), 129.29, 128.89, 127.25 (C-ar), 95.38 (C-2), 65.49 (C-4), 62.09 (C-6), 61.94 (Et), 53.18 (C-5), 43.37 (CH₂, Bn), 39.14 (C-3), 14.12 (Et).

C₁₆H₂₁NO₆: 323.34

2.3.35. 3,5-Didesoxy-5-(phenylacetylamino)-DL-*threo*-2-hexulosonsäure (**52**)



Hydrolyse von **47** nach AAV 4.

Ansatz: 320 mg (1.0 mmol) Ethyl-3,5-didesoxy-5-(phenylacetyl-amino)-DL-*threo*-hex-2-ulopyranosid **47**

Ausbeute: 265 mg (90%) **52** als farbloser Sirup.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 7.28-7.36 (m, 5H, H-ar), 3.56 (s, 2H, CH_2 Bn), 3.52-3.94 (m, 4H, H-4,5,6), 2.14 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.89 (dd, 1H, H-3_{ax}).
 $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.0$, $J_{3\text{eq},4} = 4.9$, $J_{3\text{ax},4} = 11.1$.

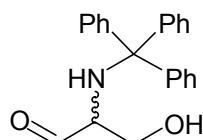
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ = 178.27 (C-1), 176.98 (C=O, PhAc), 138.07 (C-ar_i), 131.64, 131.29, 129.63 (C-ar), 99.24 (C-2), 69.26 (C-4), 64.19 (C-6), 55.42 (C-5), 45.28 (CH_2 , Bn), 42.50 (C-3).

MS (ESI, m/z (%)): 613.0 (14) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 318.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 300.1 (40) $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}]^+$

R_f -Wert: 0.76 [Aceton-1-Butanol-Wasser = 5-4-1]

$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_6$: 295.29

2.3.36. N-Trityl-2-amino-2-desoxy-DL-glycerinaldehyd (**42**)



Ozonolyse von **36** nach AAV 3.

Ansatz: 405 mg (1.0 mmol) *N*-Trityl-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **36**
in 15 ml Methanol

Ausbeute: 330 mg (quant.) **42**

Der hochempfindliche Aldehyd wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

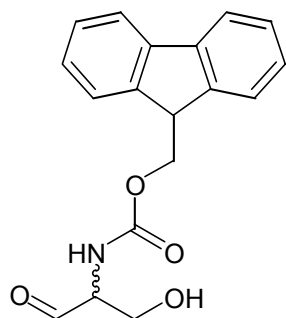
C₂₂H₂₁NO: 331.41

2.3.37. Ethyl-2,3,5-tridesoxy-5-(tritylamino)-2-methylen-DL-*threo*-hexulosonat

Indium-vermittelte Allylierung von **42** nach AAV **1a**.

Ansatz: 330 mg (1.0 mmol) *N*-Trityl-2-amino-2-desoxy-DL-glycerinaldehyd
386 mg (2.0 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)acrylat
230 mg (2.0 mmol) Indium
in 10 ml Ethanol, 2 ml 0.1 M HCl_{aq}

Die Trityl-Schutzgruppe wird unter den aciden Bedingungen der Allylierung (teilweise) gespalten. Das erhaltene, komplexe Reaktionsgemisch erwies sich chromatographisch als nicht separabel, so daß auf weitere Isolierungsversuche verzichtet wurde.

2.3.38. *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-2-amino-2-desoxy-DL-glycerinaldehyd (43)

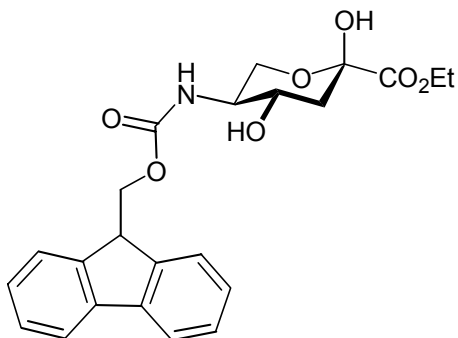
Ozonolyse von **37** nach AAV 3.

Ansatz: 1.0 g (2.6 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **37**
in 25 ml Methanol

Ausbeute: 635 mg (quant.) **43**

Der hochempfindliche Aldehyd wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

$C_{18}H_{17}NO_4$: 311.33

2.3.39. Ethyl-3,5-didesoxy-5-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-DL-*threo*-hex-2-ulo-pyranosid (48)

Indium-vermittelte Allylierung von Aldehyd **43** nach **AAV 1b**, gefolgt von Ozonolyse nach **AAV 3**.

Ansatz: 635 mg (2.6 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-2-amino-2-desoxy-DL-glycerinaldehyd **43**
1.00 g (5.2 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)acrylat
0.60 g (5.2 mmol) Indium
in 30 ml Ethanol, 6 ml 0.1 M HCl_{aq}

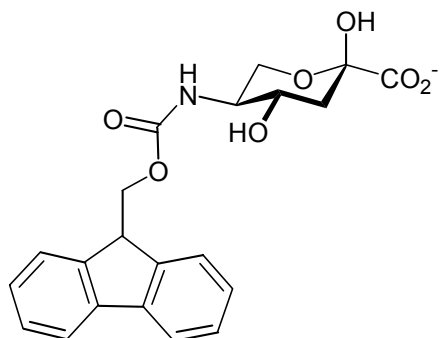
Ausbeute: 930 mg (84%) **48** als farbloser Feststoff nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol = 20:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.73 (d, 2H, Fmoc-4), 7.58 (m, 2H, Fmoc-1), 7.33 (t, 2H, Fmoc-3), 7.28 (t, 2H, Fmoc-2), 4.35 (m, 2H, CH₂, Fmoc), 4.25 (q, 2H, Et), 4.15 (m, 1H, Fmoc-9), 3.61-3.97 (m, 4H, H-4,5,6), 2.21 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.87 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.30 (t, 3H, Et).

$J_{3eq,3ax} = 12.9$, $J_{3eq,4} = 4.9$, $J_{3ax,4} = 11.2$, $J_{Et} = 7.1$, $J_{Fmoc1,2} = 7.1$, $J_{Fmoc3,4} = 7.3$ Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 171.12 (C-1), 158.87 (C=O, Fmoc), 145.30 (Fmoc-8a), 142.53 (Fmoc-4a), 128.95, 128.32, 126.34 (Fmoc-1,2,4), 121.15 (Fmoc-3), 96.43 (C-2), 72.89 (CH₂, Fmoc), 68.03 (C-6), 64.42 (C-4), 62.50 (Et), 55.34 (C-5), 40.76 (C-3), 36.65 (Fmoc-9), 14.06 (Et).

C₂₃H₂₅NO₇: 427.45

2.3.40. 3,5-Didesoxy-5-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-DL-*threo*-2-hexuloson-säure (53)

Hydrolyse von **48** nach **AAV 4**.

Ansatz: 430 mg (1.0 mmol) Ethyl-3,5-didesoxy-5-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-DL-*threo*-hex-2-ulo-pyranosat **48**

Ausbeute: 330 mg (83%) **53** als farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ = 7.73 (d, 2H, Fmoc-4), 7.58 (m, 2H, Fmoc-1), 7.33 (t, 2H, Fmoc-3), 7.28 (t, 2H, Fmoc-2), 4.35 (m, 2H, CH_2 , Fmoc), 4.15 (m, 1H, Fmoc-9), 3.60-3.95 (m, 4H, H-4,5,6), 2.20 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.86 (dd, 1H, H-3_{ax}).
 $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.9$, $J_{3\text{eq},4} = 4.9$, $J_{3\text{ax},4} = 11.2$, $J_{\text{Fmoc}1,2} = 7.1$, $J_{\text{Fmoc}3,4} = 7.3$ Hz.

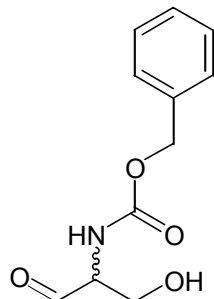
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ = 172.07 (C-1), 159.02 (C=O, Fmoc), 145.31 (Fmoc-8a), 142.67 (Fmoc-4a), 128.95, 128.32, 126.34 (Fmoc-1,2,4), 121.15 (Fmoc-3), 96.93 (C-2), 72.81 (CH_2 , Fmoc), 68.00 (C-6), 64.28 (C-4), 55.49 (C-5), 41.08 (C-3), 36.65 (Fmoc-9).

MS (ESI, m/z (%)): 421 (70) $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}]^+$, 403 (100) $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^+$

R_f -Wert: 0.83 [Aceton-1-Butanol-Wasser = 5-4-1]

$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_7$: 399.39

2.3.41. *N*-Benzyloxycarbonyl-2-amino-2-desoxy-DL-glycerinaldehyd (44)



Ozonolyse von **38** nach AAV 3.

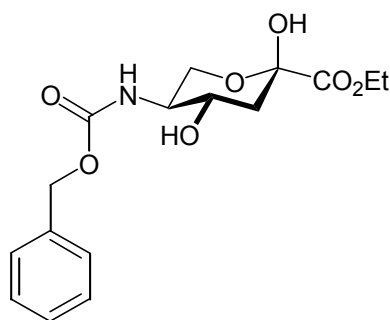
Ansatz: 890 mg (3.0 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyl-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol **38**
in 25 ml Methanol

Ausbeute: 675 mg (quant.) **44**

Der hochempfindliche Aldehyd wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

$C_{11}H_{13}NO_4$: 223.23

2.3.42. Ethyl-3,5-didesoxy-5-(benzyloxycarbonylamino)-DL-*threo*-hex-2-ulopyranosid (49)



Indium-vermittelte Allylierung von Aldehyd **44** nach AAV **1b**, gefolgt von Ozonolyse nach AAV **3**.

Ansatz: 0.68 g (3.0 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyl-2-amino-2-desoxy-DL-glycerinaldehyd **44**
1.16 g (6.0 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)-acrylat
0.69 g (6.0 mmol) Indium
in 30 ml Ethanol, 6 ml 0.1 M HCl_{aq}

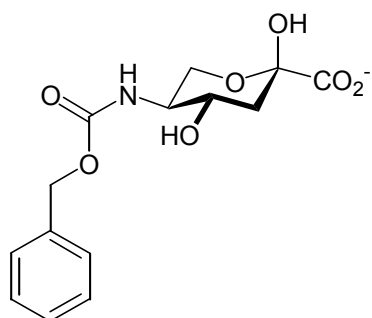
Ausbeute: 680 mg (67%) **49** als farbloser Sirup nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol = 20:1→10:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.31 (m, 5H, H-ar), 5.06 (m, 2H, CH₂, Cbz), 4.22 (q, 2H, Et), 3.60-3.93 (m, 4H, H-4,5,6), 2.21 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.99 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.30 (t, 3H, Et).
 $J_{3eq,3ax} = 11.9$, $J_{3eq,4} = 4.8$, $J_{3ax,4} = 11.2$, $J_{Et} = 7.1$ Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 170.01 (C-1), 156.97 (C=O, Cbz), 136.17 (C-ar_i), 128.68, 128.62, 128.30 (C-ar), 95.32 (C-2), 67.15 (CH₂, Cbz), 66.01 (C-4), 62.78 (Et), 62.52 (C-6), 54.35 (C-5), 38.76 (C-3), 14.06 (Et).

C₁₆H₁₇NO₇: 339.34

2.3.43. 3,5-Didesoxy-5-(benzyloxycarbonylamino)-DL-*threo*-2-hexulosonsäure (**54**)



Hydrolyse von **49** nach AAV 4.

Ansatz: 340 mg (1.0 mmol) Ethyl-3,5-didesoxy-5-(benzyloxycarbonylamino)-DL-*threo*-hex-2-ulopyranosid **49**

Ausbeute: 252 mg (81%) **54** als schwach gelber Sirup.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 7.27 (m, 5H, H-ar), 5.08 (m, 2H, CH_2 , Cbz), 3.60-3.96 (m, 4H, H-4,5,6), 2.19 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.84 (dd, 1H, H-3_{ax}).
 $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 11.9$, $J_{3\text{eq},4} = 4.8$, $J_{3\text{ax},4} = 11.4$ Hz.

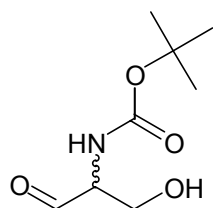
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ = 171.70 (C-1), 159.90 (C=O, Cbz), 138.35 (C-ar_i), 129.66, 129.06, 128.62 (C-ar), 96.92 (C-2), 67.65 (CH_2 , Cbz), 63.35 (C-4), 62.43 (C-6), 55.54 (C-5), 41.06 (C-3).

MS (ESI, m/z (%)): 351.1 (26) $[\text{M}+\text{NH}_3+\text{Na}]^+$, 333.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}]^+$, 315.1 (71) $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 289.1 (7) $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}-\text{CO}_2]^+$
 310.1 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$

R_f -Wert: 0.70 [Aceton-1-Butanol-Wasser = 5-4-1]

$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_7$: 311.29

2.3.44. *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-amino-2-desoxy-DL-glycerinaldehyd (**45**)



Ozonolyse von **39** nach AAV 3.

Ansatz: 526 mg (2.0 mmol) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-amino-4-phenyl-3-buten-1-ol
39
in 20 ml Methanol

Ausbeute: 390 mg (quant.) **45**

Der hochempfindliche Aldehyd wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

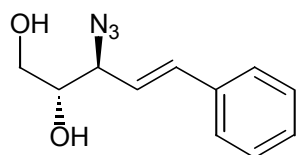
C₈H₁₅NO₄: 189.21

2.3.45. Ethyl-2,3,5-tridesoxy-5-(*tert*-butoxycarbonyl)-2-methylen-DL-*threo*-hexulose

Indium-vermittelte Allylierung von **45** nach AAV **1a**.

Ansatz: 390 mg (2.0 mmol) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-amino-2-desoxy-DL-glycerinaldehyd **45**
772 mg (4.0 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)acrylat
460 mg (4.0 mmol) Indium
in 20 ml Ethanol, 4 ml 0.1 M HCl_{aq}

Die *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe wurde unter den aciden Bedingungen der Allylierung (teilweise) gespalten. Die Komplexität des erhaltenen Reaktionsgemisches erlaubte chromatographisch keine Isolierung der gewünschten Zielverbindung, so daß auf weitere Isolierungsversuche verzichtet werden mußte.

2.3.46. (2*RS*,3*SR*)-(E)-3-Azido-5-phenyl-4-penten-1,2-diol (57**)**

Zu einer Lösung von 960 mg (6 mmol) (*E,E*)-5-Phenyl-2,4-pentadien-1-ol **55** und 38 mg (0.15 mmol) Vanadylacetylacetonat in 30 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 2.2 ml einer 5.5 molaren Lösung *tert*-Butylhydroperoxid in Decan (12.0 mmol) zugetropft. Der Reaktionsansatz wird 1.5 h bei 0°C gerührt und eine Lösung von 1.23 g (7.8 mmol) Tetramethylguanidiniumazid in 10 ml Methylenchlorid wird langsam zugetropft. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen und die wässrige Phase viermal mit je 25 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigte organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt.

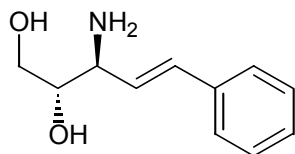
Ansatz: 960 mg (6.0 mmol) (*E,E*)-5-Phenyl-2,4-pentadien-1-ol **55**

Ausbeute: 540 mg (41%) **57** als schwach gelbes Öl, nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 2:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.19-7.37 (m, 5H, H-ar), 6.65 (d, 1H, H-5), 6.14 (dd, 1H, H-4), 4.12 (ddd, 1H, H-3), 3.64 (m, 3H, H-1,2).
J_{2,3} = 5.5, J_{3,4} = 8.4, J_{3,5} = 0.5, J_{4,5} = 15.8 Hz.

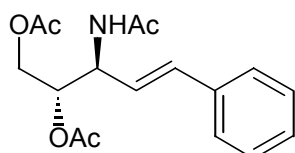
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 136.34 (C-5), 135.59 (C-ar_i), 128.68, 127.83, 126.80 (C-ar), 122.67 (C-4), 73.27 (C-2), 66.35 (C-3), 63.20 (C-1).

C₁₁H₁₃N₃O₂: 219.24

2.3.47. (2*RS*,3*SR*)-(E)-3-Amino-5-phenyl-4-penten-1,2-diol (59**)**

Eine Lösung des Azidoalkohols **57** in THF wird mit 1.1 Äquivalenten Triphenylphosphin, einigen Tropfen Wasser sowie 5-6 Siedesteinen versetzt und 48-72 h Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wird im Vakuum eingeeengt und dreimal in Chloroform aufgenommen und wieder eingeeengt. Das so erhaltene Amin-Triphenylphosphinoxid-Gemisch kann ohne weitere Aufarbeitung in die nächste Stufe eingesetzt werden.

C₁₁H₁₅NO₂: 193.24

2.3.48. (2*RS*,3*SR*)-(E)-Di-O-acetyl-N-acetyl-3-amino-5-phenyl-4-penten-1,2-diol (60**)**

Acetylierung von (2*RS*,3*SR*)-(E)-3-Amino-5-phenyl-4-penten-1,2-diol **59** nach AAV **6a**.

Ansatz: 4.0 mmol Amin **59** (Triphenylphosphinoxid-haltig)
8.0 ml Acetanhydrid
in 12.0 ml Pyridin

Ausbeute: 1.07 g (84%) **60** als farblose Kristalle nach Chromatographie an Kieselgel
(Cyclohexan : Essigester = 5:1 → 2:1).

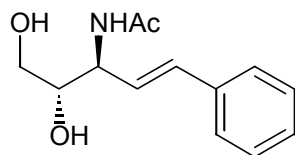
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.22-7.38 (m, 5H, H-ar), 6.53 (dd, 1H, H-4), 6.00 (dd, 1H, H-3), 5.13 (m, 1H, H-3), 4.20 (m, 1H, H-2), 4.05 (m, 2H, H-1), 1.96, 1.98, 2.00 (3s, 9H, 3xAc).

$J_{3,4} = 7.5$, $J_{3,5} = 1.0$, $J_{4,5} = 16.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 171.28, 170.79, 169.67 (3xAc), 136.21 (C-ar_i), 132.26 (C-5), 128.71, 128.16, 126.62 (C-ar), 124.07 (C-4), 73.03 (C-2), 62.87 (C-1), 51.84 (C-3), 23.47 (NHAc), 21.07, 20.89 (2xAc).

$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_5$: 319.35

2.3.49. (2*RS*,3*SR*)-(*E*)-*N*-Acetyl-3-amino-5-phenyl-4-penten-1,2-diol (**61**)



Selektives Entschützen der Alkoholfunktionen von **60** nach AAV 7.

Ansatz: 640 mg (2.0 mmol) (2*RS*,3*SR*)-(*E*)-Di-*O*-acetyl-*N*-acetyl-3-amino-5-phenyl-4-penten-1,2-diol **60**

Ausbeute: 415 mg (88%) **61** als farblose Kristalle nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol = 10:1).

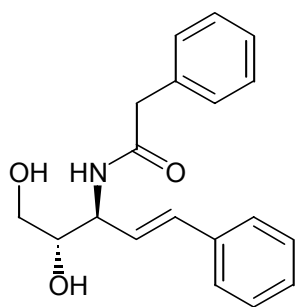
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.22-7.38 (m, 5H, H-ar), 6.59 (d, 1H, H-4), 6.23 (dd, 1H, H-3), 4.61 (ddd, 1H, H-3), 4.00 (br s, 3H, OH, NH), 3.73 (m, 1H, H-2), 3.59 (m, 2H, H-1), 2.03 (s, 3H, Ac).

$J_{2,3} = 4.9$, $J_{3,4} = 7.4$, $J_{3,5} = 1.0$, $J_{4,5} = 16.0$ Hz.

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 171.22 (Ac), 136.50 (C-ar_i), 132.93 (C-5), 128.53, 127.75, 126.41 (C-ar), 124.88 (C-4), 73.57 (C-2), 63.46 (C-1), 53.88 (C-3) 22.73 (Ac).

$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_3$: 235.28

2.3.50. (2*RS*,3*SR*)-(E)- N-Phenylacetyl -3-amino-5-phenyl-4-penten-1,2-diol (**62**)



N-Derivatisierung von Aminoalkohol **59** mit Phenyllessigsäurechlorid nach AAV **6b**.

Ansatz: 3.0 mmol Amin **59** (Triphenylphosphinoxid-haltig)
560 mg (3.6 mmol) Phenyllessigsäurechlorid
1 ml Pyridin
in 30 ml Methylenchlorid

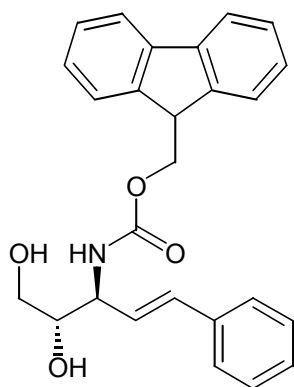
Ausbeute: 760 mg (81%) **62** als farblose Kristalle nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol = 20:1 → 10:1).

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.15-7.25 (m, 10H, H-ar), 6.34 (d, 1H, H-5), 6.10 (dd, 1H, H-4), 4.53 (m, 1H, H-3), 4.13 (br s, 2H, OH, NH), 3.57 (m, 1H, H-2), 3.47 (s, 2H, CH_2 Bn), 3.44 (m, 2H, H-1).
 $J_{3,4} = 7.0$, $J_{4,5} = 16.0$ Hz.

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 172.09 (C=O), 136.53, 135.01 (C-ar_i), 132.65 (C-5), 129.19, 128.81, 128.55, 127.77, 127.19, 126.70 (C-ar), 124.98 (C-4), 73.52 (C-2), 63.49 (C-1), 53.98 (C-3), 43.37 (CH_2 Bn).

$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_3$: 311.37

2.3.51. (2*RS*,3*SR*)-(E)-N-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-3-amino-5-phenyl-4-penten-1,2-diol (63**)**



N-Derivatisierung von Aminoalkohol **59** mit Fmoc-Chlorid nach **AAV 6c**.

Ansatz: 2.0 mmol Amin **59** (Triphenylphosphinoxid-haltig)
570 mg (2.2 mmol) Fmoc-Chlorid
in 15 ml Dioxan und 10 ml 10% Natriumcarbonat-Lsg

Ausbeute: 590 mg (71%) **63** als farblose Kristalle nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol = 20:1 → 10:1).

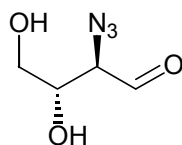
^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.75 (d, 2H, Fmoc-4), 7.60 (d, 2H, Fmoc-1), 7.20-7.39 (m, 9H, H-ar, Ph, Fmoc-2, Fmoc-3), 6.57 (d, 1H, H-5), 6.24 (dd, 1H, H-4), 4.43 (m, 2H, CH_2 Fmoc), 4.35 (m, 1H, Fmoc-9), 4.21 (m, 1H, H-3), 3.73 (m, 1H, H-2), 3.58 (m, 2H, H-1).

$$J_{3,4} = 7.0, J_{4,5} = 16.0, J_{\text{Fmoc } 1,2} = 6.8, J_{\text{Fmoc } 3,4} = 7.4 \text{ Hz.}$$

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 156.67 (C=O), 143.85 (Fmoc-8a), 141.34 (Fmoc-4a), 136.53 (C-5), 128.58, 128.16, 127.54, 127.13, 126.70, 126.56, 125.38 (C-ar, C-4), 73.69 (C-2), 66.77 (CH_2 , Fmoc), 63.61 (C-1), 55.38 (C-3), 47.26 (Fmoc-9).

$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_3$: 311.37

2.3.52. 2-Azido-2-desoxy-DL-erythrose (**58**)



Ozonolyse von **57** nach AAV 3.

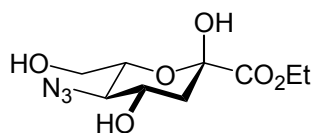
Ansatz: 350 mg (1.6 mmol) (2*RS*,3*SR*)-(E)-3-Azido-5-phenyl-4-penten-1,2-diol **57**
in 15 ml Methanol

Ausbeute: 240 mg (quant.)

Der hochempfindliche Aldehyd **58** wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

$\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_3$: 145.12

2.3.53. Ethyl-3,5-didesoxy-5-azido-DL-*arabino*-hept-2-ulopyranosid (67)



Indium-vermittelte Allylierung von Aldehyd **58** nach **AAV 1a**, gefolgt von Ozonolyse nach **AAV 3**.

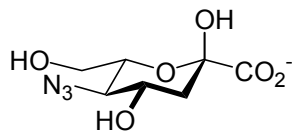
Ansatz: 240 mg (1.6 mmol) 2-Azido-2-desoxy-DL-erythrose **58**
 617 mg (3.2 mmol) Ethyl-2-(bromomethyl)acrylat
 370 mg (3.2 mmol) Indium
 in 20 ml Ethanol, 4 ml 0.1 M HCl_{aq}

Ausbeute: 260 mg (63%) **67** als farbloser Sirup nach Chromatographie an Kieselgel
 (Chloroform : Methanol = 10:1→5:1).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 4.16 (q, 2H, Et), 3.56-3.90 (m, 5H, H-4,5,6,7), 1.99 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.73 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.24 (t, 3H, Et).
 $J_{3eq,3ax} = 12.6$, $J_{3eq,4} = 4.8$, $J_{3ax,4} = 11.4$, $J_{Et} = 7.1$ Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 170.13 (C-1), 95.15 (C-2), 72.45 (C-6), 67.92 (C-5), 63.66 (C-4), 61.98 (C-7), 61.85 (Et), 39.42 (C-3), 14.01 (Et).

C₉H₁₅N₃O₆: 261.23

2.3.54. 3,5-Didesoxy-5-azido-DL-arabino-2-heptulosonsäure (71)

Hydrolyse von **67** nach **AAV 4**.

Ansatz: 260 mg (1.0 mmol) Ethyl-3,5-didesoxy-5-azido-DL-arabino-hept-2-ulo-pyranosat **67**

Ausbeute: 215 mg (92%) **71** als schwach gelber Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 3.59-3.96 (m, 5H, H-4,5,6,7), 2.17 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.74 (dd, 1H, H-3_{ax}).

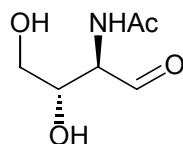
$J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.1$, $J_{3\text{eq},4} = 5.0$, $J_{3\text{ax},4} = 11.6$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ = 175.83 (C-1), 98.01 (C-2), 74.84 (C-6), 70.61 (C-5), 65.52 (C-4), 63.68 (C-7), 41.57 (C-3).

MS (ESI, m/z (%)): 452.9 (37) $[2\text{M}+\text{Na}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, 270.1 (49) $[\text{M}+2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$, 256.0 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 238.1 (71) $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}]^+$

R_f -Wert: 0.56 [Aceton-1-Butanol-Wasser = 5-4-1]

$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_6$: 233.18

2.3.55. *N*-Acetyl-2-amino-2-desoxy-DL-erythrose (64)

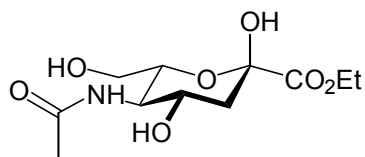
Ozonolyse von **61** nach **AAV 3**.

Ansatz: 300 mg (1.28 mmol) (2*RS*,3*SR*)-(*E*)-*N*-Acetyl-3-amino-5-phenyl-4-penten-1,2-diol **61**
in 15 ml Methanol

Ausbeute: 210 mg (quant.) **64**

Der hochempfindliche Aldehyd **64** wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

C₆H₁₁NO₄: 161.16

2.3.56. Ethyl-3,5-didesoxy-5-(acetylamino)-DL-*arabino*-hept-2-ulo-pyranosat (68)

Indium-vermittelte Allylierung von Aldehyd **64** nach **AAV 1a**, gefolgt von Ozonolyse nach **AAV 3**.

Ansatz: 210 mg (1.28 mmol) *N*-Acetyl-2-amino-2-desoxy-DL-erythrose **64**
482 mg (2.5 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)acrylat

288 mg (2.5 mmol) Indium
in 15 ml Ethanol, 3 ml 0.1 M HCl_{aq}

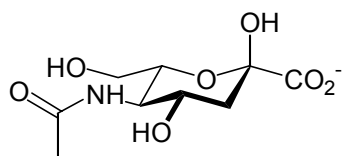
Ausbeute: 230 mg (65%) **68** als schwach gelber Sirup nach Chromatographie an Kieselgel
(Chloroform : Methanol =10:1→5:1).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 4.24 (q, 2H, Et), 3.60-3.97 (m, 5H, H-4,5,6,7), 2.15 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.00 (s, 3H, Ac), 1.80 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.24 (t, 3H, Et).
 $J_{3eq,3ax} = 13.0$, $J_{3eq,4} = 4.9$, $J_{3ax,4} = 11.2$, $J_{Et} = 7.1$ Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 175.88 (Ac), 171.13 (C-1), 97.34 (C-2), 74.64 (C-6), 68.43 (C-4), 64.87 (C-7), 62.45 (Et), 55.02 (C-5), 41.07 (C-3), 25.02 (Ac), 14.01 (Et).

C₁₁H₁₉NO₇: 277.27

2.3.57. 3,5-Didesoxy-5-(acetylamino)-DL-*arabino*-2-heptulosonsäure (72)



Hydrolyse von **68** nach **AAV 4**.

Ansatz: 140 mg (0.50 mmol) Ethyl-3,5-dideoxy-5-(acetylamino)-DL-*arabino*-hept-2-
ulopyranosid **68**

Ausbeute: 105 mg (84%) **72** als schwach gelber Sirup.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 3.65-3.99 (m, 5H, H-4,5,6,7), 2.31 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.06 (s, 3H, Ac), 1.87 (dd, 1H, H-3_{ax}).

$J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.0$, $J_{3\text{eq},4} = 5.0$, $J_{3\text{ax},4} = 11.6$ Hz.

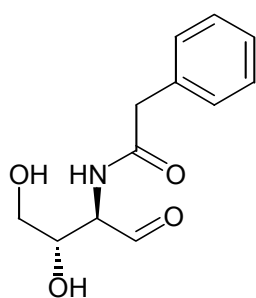
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ = 177.77 (Ac), 176.08 (C-1), 98.17 (C-2), 75.80 (C-6), 69.39 (C-4), 63.80 (C-7), 55.22 (C-5), 41.68 (C-3), 25.03 (Ac).

MS (ESI, m/z (%)): 521.1 (14) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 272.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$
497.0 (10) $[2\text{M}-\text{H}]^-$, 248 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$, 230 (41) $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$

R_f -Wert: 0.49 [Aceton-1-Butanol-Wasser = 5-4-1]

$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_7$: 249.22

2.3.58. *N*-Phenylacetyl-2-amino-2-desoxy-DL-erythrose (65)



Ozonolyse von **62** nach AAV 3.

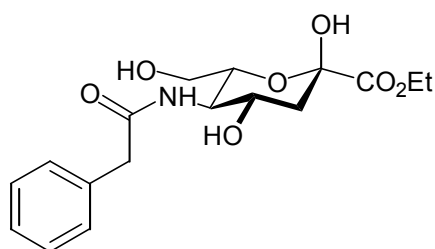
Ansatz: 310 mg (1.0 mmol) (2*RS*,3*SR*)-(*E*)-*N*-Phenylacetyl-3-amino-5-phenyl-4-penten-1,2-diol **62**
in 15 ml Methanol

Ausbeute: 240 mg (quant.) **65**

Der hochempfindliche Aldehyd **65** wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

$C_{12}H_{15}NO_4$: 237.25

2.3.59. Ethyl-3,5-didesoxy-5-(phenylacetyl-amino)-DL-*arabino*-hept-2-ulo-pyranosid (**69**)



Indium-vermittelte Allylierung von Aldehyd **65** nach **AAV 1b**, gefolgt von Ozonolyse nach **AAV 3**.

Ansatz: 240 mg (1.0 mmol) *N*-Phenylacetyl-2-amino-2-desoxy-DL-erythrose **65**
386 mg (2.0 mmol) Ethyl-2-(bromomethyl)acrylat
230 mg (2.0 mmol) Indium
in 15 ml Ethanol, 3 ml 0.1 M HCl_{aq}

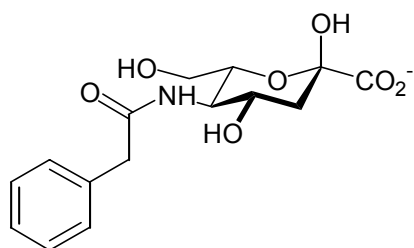
Ausbeute: 280 mg (79%) **69** als farbloser Sirup nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol = 10:1 → 5:1).

1H -NMR (300 MHz, CD_3OD): δ = 7.13-7.24 (m, 5H, H-ar), 4.12 (q, 2H, Et), 3.48 (s, 2H, CH_2 Bn) 3.42-3.94 (m, 5H, H-4,5,6,7), 2.12 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.76 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.20 (t, 3H, Et).
 $J_{3eq,3ax} = 12.8$, $J_{3eq,4} = 4.9$, $J_{3ax,4} = 11.6$, $J_{Et} = 7.1$ Hz.

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD): δ = 175.28 (C=O), 171.64 (C-1), 136.96 (C-ar_i), 130.28, 129.80, 128.14 (C-ar), 96.50 (C-2), 74.94 (C-6), 67.77 (C-4), 63.18 (C-7), 63.06 (Et), 54.45 (C-5), 44.11 (CH_2 Bn), 41.18 (C-3), 14.66 (Et).

$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_7$: 353.37

2.3.60. 3,5-Didesoxy-5-(phenylacetyl-amino)-DL-*arabino*-2-heptulosonsäure (73)



Hydrolyse von **69** nach AAV 4.

Ansatz: 140 mg (0.40 mmol) Ethyl-3,5-dideoxy-5-(phenylacetyl-amino)-DL-*arabino*-hept-2-ulo-pyranosid **69**

Ausbeute: 115 mg (88%) **73** als farbloser Feststoff nach Lyophilisation.

^1H -NMR (300 MHz, D_2O): δ = 7.28-7.40 (m, 5H, H-ar), 3.63 (s, 2H, CH_2 Bn), 3.50-3.91 (m, 5H, H-4,5,6,7), 2.33 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.84 (dd, 1H, H-3_{ax}).
 $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.9$, $J_{3\text{eq},4} = 4.9$, $J_{3\text{ax},4} = 11.8$ Hz.

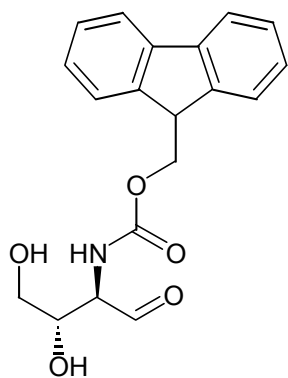
^{13}C -NMR (75 MHz, D_2O): δ = 178.16 (C=O), 175.66 (C-1), 137.72 (C-ar_i), 131.92, 131.78, 130.19 (C-ar), 97.81 (C-2), 75.70 (C-6), 68.94 (C-4), 63.86 (C-7), 55.16 (C-5), 45.10 (CH_2 Bn), 41.79 (C-3).

MS (ESI, m/z (%)): 696.3 (12) $[2M+2Na]^+$, 418.1 (100) $[M+Na+4H_2O]^+$, 400.1 (95) $[M+Na+3H_2O]^+$

R_F-Wert: 0.63 [Aceton-1-Butanol-Wasser = 5-4-1]

C₁₅H₁₉NO₇: 325.31

2.3.61. *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-2-amino-2-desoxy-DL-erythrose (**66**)



Ozonolyse von **63** nach AAV 3.

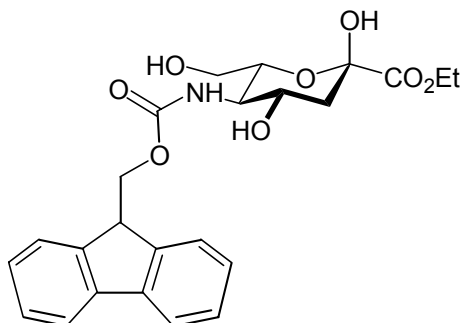
Ansatz: 330 mg (0.8 mmol) (2*RS*,3*SR*)-(*E*)-*N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-3-amino-5-phenyl-4-penten-1,2-diol **63**
in 15 ml Methanol

Ausbeute: 275 mg (quant.) **66**

Der hochempfindliche Aldehyd **66** wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

C₁₉H₁₉NO₅: 341.36

2.3.62. Ethyl-3,5-didesoxy-5-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-DL-*arabino*-hept-2-ulo-pyranosac (70)



Indium-vermittelte Allylierung von Aldehyd **66** nach **AAV 1b**, gefolgt von Ozonolyse nach **AAV 3**.

Ansatz: 275 mg (0.80 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-2-amino-2-desoxy-DL-erythrose **66**
 310 mg (1.6 mmol) Ethyl-2-(bromomethyl)-acrylat
 184 mg (1.6 mmol) Indium
 in 15 ml Ethanol, 3 ml 0.1 M HCl_{aq}

Ausbeute: 290 mg (79%) **70** als farbloser Feststoff nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol = 20:1).

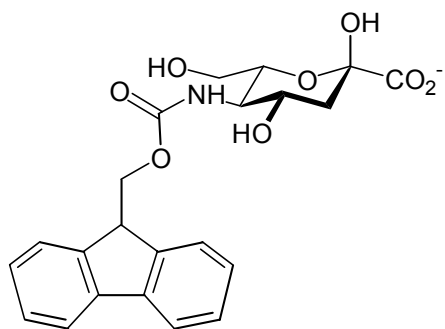
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.77 (d, 2H, Fmoc-4), 7.62 (d, 2H, Fmoc-1), 7.38 (t, 2H, Fmoc-3), 7.30 (t, 2H, Fmoc-2), 4.45 (m, 2H, CH₂, Fmoc), 4.25 (q, 2H, Et), 4.20 (m, 1H, Fmoc-9), 3.77-4.07 (m, 5H, H-4,5,6,7), 2.25 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.90 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.30 (t, 3H, Et).

$J_{3eq,3ax} = 12.8$, $J_{3eq,4} = 4.9$, $J_{3ax,4} = 11.7$, $J_{Et} = 7.1$, $J_{Fmoc1,2} = 7.0$, $J_{Fmoc3,4} = 7.3$ Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 170.44 (C-1), 157.97 (C=O, Fmoc), 143.93 (Fmoc-8a), 141.34 (Fmoc-4a), 127.74, 127.11, 126.05 (Fmoc-1,2,4), 120.01 (Fmoc-3), 95.04 (C-2), 72.89 (C-6), 66.79 (CH₂ Fmoc), 66.61 (C-4), 62.30 (Et), 61.96 (C-7), 54.68 (C-5), 40.20 (C-3), 39.43 (Fmoc-9), 13.78 (Et).

$C_{24}H_{27}NO_8$: 457.47

2.3.63. 3,5-Didesoxy-5-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-DL-*arabino*-2-heptulonsäure (74)



Hydrolyse von **70** nach **AAV 4**.

Ansatz: 230 mg (0.50 mmol) Ethyl-3,5-dideoxy-5-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-DL-*arabino*-hept-2-ulo-pyranosid **70**

Ausbeute: 198 mg (92%) **74** als farbloser Feststoff nach Lyophilisation.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ = 7.79 (d, 2H, Fmoc-4), 7.62 (d, 2H, Fmoc-1), 7.28-7.38 (m, 24H, Fmoc-2,3), 4.39 (m, 2H, CH_2 , Fmoc), 4.30 (m, 1H, Fmoc-9), 4.18 (m, 1H, H-6), 3.66-3.95 (m, 4H, H-4,5,7), 2.25 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.80 (dd, 1H, H-3_{ax}).

$J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.8$, $J_{3\text{eq},4} = 4.8$, $J_{3\text{ax},4} = 11.6$, $J_{\text{Et}} = 7.1$, $J_{\text{Fmoc}1,2} = 7.0$, $J_{\text{Fmoc}3,4} = 7.3$ Hz.

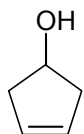
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ = 173.92 (C-1), 159.92 (C=O, Fmoc), 145.37 (Fmoc-8a), 142.56 (Fmoc-4a), 128.93, 128.31, 126.34 (Fmoc-1,2,4), 120.30 (Fmoc-3), 96.39 (C-2), 74.98 (C-6), 71.84 (CH_2 Fmoc), 67.87 (C-4), 64.86 (C-7), 54.89 (C-5), 41.34 (C-3), 40.49 (Fmoc-9).

MS (ESI, m/z (%)): 474.2 (45) $[M+2Na-H]^+$, 452.2 (40) $[M+Na]^+$, 434.2 (100) $[M+Na-H_2O]^+$
428.1 (100) $[M-H]^-$

R_f -Wert: 0.77 [Aceton-1-Butanol-Wasser = 5-4-1]

$C_{22}H_{23}NO_8$: 429.42

2.3.64. Cyclopent-3-enol (75)



Hydroborierung von Cyclopentadien.

Zu 13.2 g (0.2 mol) frisch destilliertem Cyclopentadien in 100 ml absolutem THF werden unter Eiskühlung langsam 6.15 ml (60 mmol) Boran(3)-DMS-Komplex zugetropft. Der Reaktionsansatz wird 1 h bei 0°C gerührt, tropfenweise mit 16 ml Wasser, dann in einer Portion mit 20 ml 3N Natronlauge und anschließend vorsichtig mit 20 ml 30%iger Wasserstoffperoxidlösung versetzt. Nach beendeter Zugabe wird eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt, die Reaktionsmischung im Vakuum auf die Hälfte eingeeengt und dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet.

Ansatz: 13.2 g (0.2 mol) Cyclopentadien
6.15 ml (60 mmol) Boran(3)-DMS-Komplex

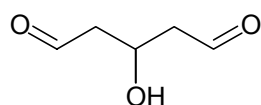
Ausbeute: 2.0 g (23.8 mmol, 13%) **75** als farbloses Öl nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.68$ (br. s, 2H, H-3), 4.47 (br. s, 1H, H-1), 2.42 (m, 5H, H-2, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 128.38$ (C-3), 71.48 (C-1), 42.70 (C-2).

$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}$: 84.12

2.3.65. 3-Hydroxypentandial (**76**)



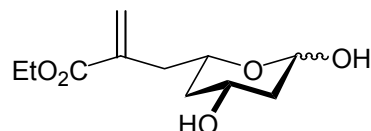
Ozonolyse von Cyclopent-3-enol **75** nach **AAV 3**.

Ansatz: 250 mg (3.0 mmol) Cyclopent-3-enol **75**

Ausbeute: 350 mg (quant.) 3-Hydroxypentandial **76**

Der hochempfindliche Dialdehyd **76** wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3$: 116.12

2.3.66. Ethyl-2-(1'-methyl-tetrahydropyran-4',6'-diol)acrylat (77)

Indium-vermittelter Allylierung 3-Hydroxypentandial **76** nach **AAV 1b**.

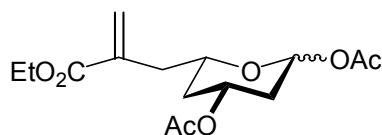
Ansatz: 350 mg (3.0 mmol) 3-Hydroxypentandial **76**
 580 mg (3.0 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)-acrylat
 345 mg (3.0 mmol) Indium
 in 20 ml Ethanol, 4 ml 0.1 M HCl_{aq}

Ausbeute: 220 mg (0.95 mmol, 32%) **77** ($\alpha:\beta = 1:1$) als farbloser Sirup nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol = 10:1 \rightarrow 5:1).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 6.22 (dd, 1H, =CH_{2a}), 5.66 (dd, 1H, =CH_{2b}), 5.36 (d, 0.5H, H-8 α), 4.67 (d, 0.5H, H-8 β), 4.20 (q, 2H, Et), 4.08-4.20 (m, 2H, H-4,6), 2.41-2.59 (m, 2H, H-5), 1.91-2.11 (m, 2H, H-3), 1.42-1.55 (m, 2H, H-7), 1.30 (t, 3H, Et).
 $J_{7,8\alpha} = 2.8$, $J_{7,8\beta} = 9.6$, $J_{Et} = 7.1$ Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 167.48 (C-1 α), 167.29 (C-1 β), 137.08 (C-2 α), 136.69 (C-2 β), 127.72 (=CH₂ β), 127.39 (=CH₂ α), 94.35 (C-8 β), 92.47 (C-8 α), 70.60 (C-4 β), 66.50 (C-4 α), 63.21 (C-6 β), 61.07 (C-6 α), 60.92 (Et), 42.17, 39.73, 38.13 (C-3 β , 5 β , 7 β), 40.50, 39.50, 38.25 (C-3 α , 5 α , 7 α), 14.11 (Et).

C₁₁H₁₈O₅: 230.26

2.3.67. Ethyl-2-(1'-methyl-tetrahydropyran-di-O-acetyl-4',6'-diol)acrylat (77-Ac)

Acetylierung von **77** nach **AAV 2**.

Ansatz: 115 mg (0.5 mmol) **77**

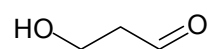
Ausbeute: 150 mg (0.48 mmol, 96%) **77-Ac** als farbloser Sirup.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.22 (m, 1H, $=\text{CH}_{2a}$), 6.21 (m, 0.5H, H-8 α), 5.68 (m, 1.5H, $=\text{CH}_{2b}$, H-8 β), 5.17 (m, 0.5H, H-6 β), 4.95 (m, 0.5H, H-6 α), 4.21 (q, 2H, Et), 4.13 (m, 0.5H, H-4 β), 3.74 (m, 0.5H, H-4 α), 2.45-2.70 (m, 1H, H-5), 2.07, 2.07, 2.05, 2.04 (4s, 12H, 4xAc), 1.54-1.78 (m, 1H, H-3), 1.30-1.44 (m, 1H, H-7), 1.29 (t, 3H, Et).

J_{Et} = 7.1 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 170.20, 170.05, 169.62, 168.82 (4xAc), 166.90 (C-1 α), 166.75 (C-1 β), 136.25 (C-2 α), 136.10 (C-2 β), 127.52 ($=\text{CH}_2\beta$), 127.43 ($=\text{CH}_2\alpha$), 92.24 (C-8 β), 91.95 (C-8 α), 71.26 (C-4 β), 68.44 (C-4 α), 68.20 (C-6 β), 66.26 (C-6 α), 60.69 (Et), 37.83, 37.42, 36.40, 35.93, 35.73, 34.39, (C-3,5,7), 14.13 (Et).

$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_7$: 314.33

2.3.68. 3-Hydroxypropionaldehyd (79)

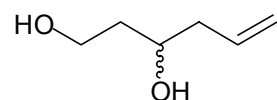
Ozonolyse von 3-Butenol nach **AAV 3**.

Ansatz: 720 mg (10.0 mmol) 3-Butenol

Ausbeute: 750 mg (quant.) 3-Hydroxypropionaldehyd **79**

Der hochempfindliche Aldehyd **79** wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

$C_3H_6O_2$: 74.08

2.3.69. Hex-5-en-1,3-diol (80)

Indium-vermittelte Allylierung von 3-Hydroxypropionaldehyd **79** mit Allylbromid nach **AAV 1b**.

Ansatz: 0.75 g (10.0 mmol) 3-Hydroxypropionaldehyd **79**
3.63 g (30.0 mmol) Allylbromid
2.30 g (20.0 mmol) Indium
in 50 ml Ethanol, 10 ml 0.1 M HCl_{aq}

Ausbeute: 950 mg (8.2 mmol, 82%) **80** als farbloser Sirup.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.71 (m, 1H, H-5), 5.05 (m, 2H, H-6), 3.90 (m, 2H, H-1), 3.78 (m, 1H, H-3), 2.20 (m, 2H, H-4), 1.67 (m, 2H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 134.39 (C-5), 118.38 (C-6), 71.35 (C-3), 61.64 (C-1), 42.17 (C-4), 37.10 (C-2).

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$: 116.16

2.3.70. 2,4-Didesoxypentose (78)



Ozonolyse von Hex-5-en-1,3-diol **80** nach AAV 3.

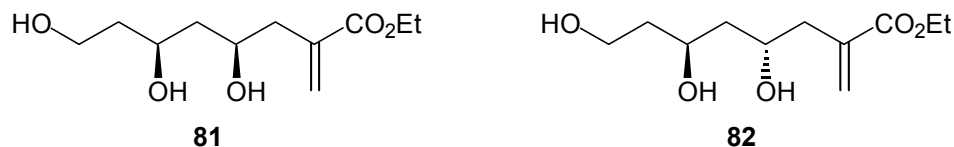
Ansatz: 580 mg (5.0 mmol) Hex-5-en-1,3-diol **80**
In 25 ml Methanol

Ausbeute: 560 mg (4.7 mmol, 95%) **78** als farbloser Feststoff (α : β = 55:45).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ = 5.17 (dd, 0.55H, H-1 α), 4.63 (m, 0.45H, H-1 β), 3.65-4.05 (m, 2H, H-5), 3.30-3.44 (m, 1H, H-3), 1.31-2.09 (m, 4H, H-2,4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ = 95.78 (C-1 β), 93.41 (C-1 α), 67.57 (C-3 β), 64.63 (C-3 α), 62.65 (C-5 β), 60.19 (C-5 α), 43.39 (C-2 β), 41.22 (C-2 α), 35.64 (C-4 β), 35.50 (C-4 α).

$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3$: 118.13

2.3.71. Ethyl-2,3,5,7-tetradesoxy-2-methylen-octonat (81/82)

Indium-vermittelte Allylierung von 2,4-Didesoxypentose **78** nach AAV **1b**.

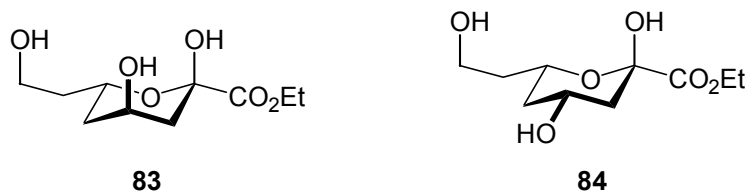
Ansatz: 295 mg (2.5 mmol) 2,4-Didesoxypentose
 965 mg (5.0 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)-acrylat
 575 mg (5.0 mmol) Indium
 in 25 ml Ethanol, 5 ml 0.1 M HCl_{aq}

Ausbeute: 390 mg (1.7 mmol, 67%) 3:2-Gemisch der diastereomeren, racemischen Ester
 nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol = 10:1)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.19 (m, 1H, =CH_{2a}), 5.61 (m, 1H, =CH_{2b}), 4.14 (q, 2H, Et),
 3.95-4.09 (m, 2H, H-4,6), 3.71-3.79 (m, 1H, H-8), 2.33-2.50 (m, 2H, H-3),
 1.49-1.66 (m, 4H, H-5,7), 1.24 (t, 3H, Et).
 J_{Et} = 7.1 Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 167.96 (C-1), 137.51, 137.08 (C-2), 128.25, 127.99 (=CH₂),
 72.04, 71.41 (C-4), 68.62, 67.93 (C-6), 61.27, 60.99 (C-8), 61.23 (Et), 42.90,
 42.78 (C-7), 40.96, 40.45 (C-3), 38.84, 38.58 (C-5), 14.22 (Et).

C₁₁H₂₀O₅: 232.27

2.3.72. Ethyl-3,5,7-tridesoxy-oct-2-ulopyranosid (83/84)

Ozonolyse von **81/82** nach AAV 3.

Ansatz: 300 mg (1.3 mmol) **81/82**
 in 15 ml Methanol

Ausbeute: 130 mg (0.56 mmol, 43%) **83** und 90 mg (0.38 mmol, 30%) **84** nach
Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol = 10:1 → 5:1)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) von **83**: δ = 4.17 (m, 3H, H-4, Et), 3.58-3.79 (m, 3H, H-6,8),
1.47-1.98 (m, 6H, H-3,5,7), 1.24 (t, 3H, Et).
 $J_{\text{Et}} = 7.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) von **83**: δ = 169.66 (C-1), 95.64 (C-2), 64.36, 63.30 (C-4,6),
61.82 (Et), 59.11 (C-8), 37.64, 37.54, 35.74 (C-3,5,7), 14.06 (Et).

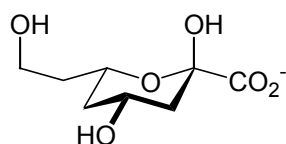
$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_6$: 234.25

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) von **84**: δ = 4.15 (q, 2H, Et), 3.99-4.10 (m, 2H, H-4,6), 3.55-
3.70 (m, 2H, H-8), 2.06 (ddd, 1H, H-3_{eq}), 1.87 (m, 1H, H-5_{eq}), 1.68 (m, 2H, H-
5_{ax}, H-7a), 1.59 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.28 (m, 1H, H-7b), 1.22 (t, 3H, Et).
 $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.5$, $J_{3\text{eq},4} = 4.6$, $J_{3\text{ax},4} = 11.5$, $J_{3\text{eq},5} = 1.6$, $J_{\text{Et}} = 7.1$ Hz.

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) von **84**: δ = 170.63 (C-1), 95.58 (C-2), 67.51 (C-4), 63.57 (C-6), 61.98 (Et), 58.80 (C-8), 40.03, 39.61, 37.49 (C-3,5,7), 13.75 (Et).

$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_6$: 234.25

2.3.73. 3,5,7-Tridesoxy-2-octulosonsäure (**85**)



Hydrolyse von **84** nach AAV 4.

Ansatz: 90 mg (0.38 mmol) **84**

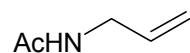
Ausbeute: 62 mg (0.30 mmol, 79%) **85** als farbloser Feststoff nach Lyophilisation

^1H -NMR (300 MHz, D_2O): δ = 4.05-4.15 (m, 2H, H-4,6), 3.63-3.71 (m, 2H, H-8), 2.18 (ddd, 1H, H-3_{eq}), 2.04 (m, 1H, H-5_{eq}), 1.79 (m, 2H, H-5_{ax}, H-7a), 1.62 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.30 (m, 1H, H-7b).

$J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.6$, $J_{3\text{eq},4} = 4.7$, $J_{3\text{ax},4} = 11.5$, $J_{3\text{eq},5} = 1.7$ Hz.

^{13}C -NMR (75 MHz, D_2O): δ = 177.09 (C-1), 98.70 (C-2), 70.44 (C-4), 66.52 (C-6), 61.00 (C-8), 41.90, 41.27, 39.80 (C-3,5,7).

$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_6$: 206.19

2.3.75. *N*-Acetyl-allylamin (88)

Acetylierung von Allylamin nach **AAV 6a**.

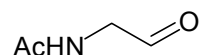
Ansatz: 579 mg (10.0 mmol) Allylamin

Ausbeute: 750 mg (76 %) **88** als farblose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.66 (br s, 1H, NH), 5.72 (m, 1H, H-2), 5.06 (m, 2H, H-3), 3.75 (t, 2H, H-1), 1.92 (s, 3H, Ac).
 $J_{1,2} = 5.5$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 170.57 (Ac), 134.27 (C-2), 116.16 (C-3), 42.05 (C-1), 23.07 (Ac).

$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}$: 99.07

2.3.76. *N*-Acetyl-2-amino-acetaldehyd (89)

Ozonolyse von **88** nach **AAV 3**.

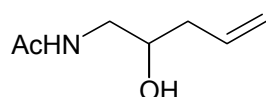
Ansatz: 495 mg (5.0 mmol) *N*-Acetyl-allylamin **88**
in 30 ml Methanol

Ausbeute: 550 mg (quant.) **89**

Der hochempfindliche Aldehyd **89** wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2$: 101.05

2.3.77. *N*-Acetyl-1-amino-2-hydroxy-4-penten (**90**)



Indium-vermittelte Allylierung von *N*-Acetyl-2-amino-acetaldehyd **89** mit Allylbromid nach **AAV 1b**.

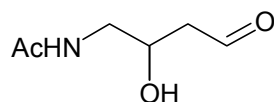
Ansatz: 550 mg (5.0 mmol) *N*-Acetyl-2-amino-acetaldehyd (0.1 eq DMSO) **89**

Ausbeute: 440 mg (61 %) **90** als farbloser Sirup.

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.79 (br s, 1H, NH), 5.74 (m, 1H, H-4), 5.08 (m, 2H, H-5), 3.71 (m, 2H, H-1), 3.06 (m, 1H, H-2), 2.18 (m, 2H, H-3), 1.98 (s, 3H, Ac).

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 172.08 (Ac), 134.11 (C-4), 118.18 (C-5), 70.19 (C-2), 45.47 (C-1), 39.53 (C-3), 23.11 (Ac).

$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_2$: 143.09

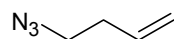
2.3.78. *N*-Acetyl-4-amino-3-hydroxy-butanal (87)

Ozonolyse von **90** nach AAV 3.

Ansatz: 430 mg (3.0 mmol) *N*-Acetyl-1-amino-2-hydroxy-4-penten **90**
in 20 ml Methanol

Ausbeute: 460 mg eines komplexen Reaktionsgemisches, welches dünnschicht-
chromatographisch Zersetzung des Aldehyds innerhalb weniger Minuten
anzeigte

$C_6H_{11}NO_3$: 145.07

2.3.79. 1-Azido-3-buten (91)

Eine 1 molare Lösung des Bromids in DMSO wird mit 1.5 Äquivalenten Natriumazid versetzt. Der Reaktionsansatz wird bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt, mit zwei Volumen-Äquivalenten Wasser versetzt und mit Diethylether extrahiert. Die über Natriumsulfat getrocknete organische Phase wird abfiltriert und destilliert.

Ansatz: 2.70 g (20.0 mmol) 1-Brom-3-buten
1.95 g (30.0 mmol) Natriumazid

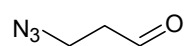
Ausbeute: 1.44 g (74%) **91** als farblose Flüssigkeit nach Destillation ($Sdp_{50} = 20^{\circ}C$)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.72 (m, 1H, H-3), 5.05 (m, 2H, H-4), 3.25 (t, 2H, H-1),
2.29 (m, 2H, H-2).
 $J_{1,2} = 6.9$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 134.35 (C-3), 117.58 (C-4), 50.61 (C-1), 33.25 (C-2).

$\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3$: 97.06

2.3.80. 3-Azido-propanal (**92**)



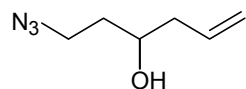
Ozonolyse von **91** nach AAV 3.

Ansatz: 582 mg (6.0 mmol) 1-Azido-3-buten **91**
in 30 ml Methanol

Ausbeute: 600 mg (quant.) **92**

Der hochempfindliche Aldehyd **92** wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

$\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_3\text{O}$: 99.04

2.3.81. 1-Azido-3-hydroxy-5-hexen (93)

Indium-vermittelte Allylierung von 3-Azido-propanal **92** mit Allylbromid nach **AAV 1b**.

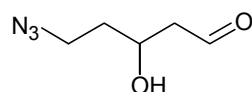
Ansatz: 600 mg (6.0 mmol) 3-Azido-propanal **92**
2.18 g (18.0 mmol) Allylbromid
1.38 g (12.0 mmol) Indium
in 40 ml Ethanol, 8 ml 0.1 M HCl_{aq}

Ausbeute: 290 mg (34 %) **93** als farbloser Sirup.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.74 (m, 1H, H-5), 5.08 (m, 2H, H-6), 3.74 (m, 1H, H-3),
3.40 (t, 2H, H-1), 2.18 (m, 2H, H-4), 1.68 (m, 2H, H-2).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 134.23 (C-5), 118.56 (C-6), 68.12 (C-3), 48.47 (C-1), 42.15
(C-4), 35.47 (C-2).

C₆H₁₁N₃O: 141.09

2.3.82. 5-Azido-3-hydroxy-pentanal (94)

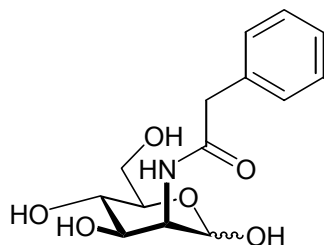
Ozonolyse von **93** nach **AAV 3**.

Ansatz: 290 mg (2.1 mmol) 1-Azido-3-hydroxy-5-hexen
in 15 ml Methanol

Ausbeute: 300 mg eines komplexen Reaktionsgemisches, welches dünn-schicht-chromatographisch Zersetzung des Aldehyds innerhalb weniger Minuten anzeigte

$C_5H_9N_3O_2$: 143.07

2.3.83. *N*-Phenylacetyl-2-amino-2-desoxy-D-mannopyranose (**95**)



N-Derivatisierung von D-Mannosamin mit Phenyllessigsäurechlorid nach **AAV 6b**.

Ansatz: 650 mg (3.0 mmol) $ManNH_2 \cdot HCl$
178 mg (3.3 mmol) Na-Methanolat
555 mg (3.6 mmol) Phenyllessigsäurechlorid
in 20 ml Methanol

Ausbeute: 600 mg (67%) **95** als farblose Kristallmasse nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol = 5:1→3:1)

Anomerenverhältnis: $\alpha : \beta = 61 : 39$

1H -NMR (300 MHz, D_2O): $\delta = 7.30$ - 7.44 (m, 5H, H-ar), 5.09 (d, 0.61H, H-1 α), 5.02 (d, 0.39H, H-1 β), 4.45 (dd, 0.39H, H-2 β), 4.32 (dd, 0.61H, H-2 α), 4.08 (dd,

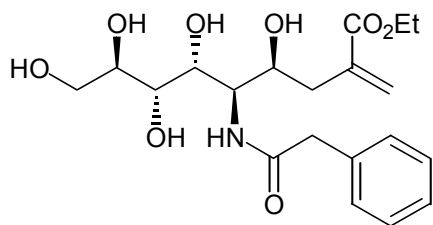
0.61H, H-3 α), 3.84 (s, 2H, CH₂ Bn), 3.61-3.90 (m, 3.61H, H-3 β ,4- α ,5- α ,6), 3.52 (dd, 0.39H, H-4 β), 3.41 (m, 0.39H, H-5 β).

$J_{\alpha 1,2} = 1.4$, $J_{\beta 1,2} = 1.6$, $J_{\alpha 2,3} = 4.6$, $J_{\beta 2,3} = 4.3$, $J_{\alpha 3,4} = 9.6$, $J_{\beta 3,4} = 9.7$, $J_{\beta 4,5} = 9.7$ Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): δ = 178.76 (C=O β), 177.92 (C=O α), 137.78 (C-ar_i), 132.11, 131.93, 131.69, 131.63, 130.05, 130.00 (C-ar α/β), 95.84 (C-1 α), 95.70 (C-1 β), 79.11 (C-5 β), 74.79 (C-5 α), 74.78 (C-3 β), 71.59 (C-3 α), 69.51 (C-4 α), 69.26 (C-4 β), 63.16 (C-6 α/β), 57.00 (C-2 β), 56.11 (C-2 α), 44.90 (CH₂ Bn).

C₁₄H₁₉NO₆: 297.30

2.3.84. Ethyl-2,3,5-tridesoxy-2-methylen-5-(phenylacetyl-amino)-D-glycero-D-galactonononat (96)



Indium-vermittelte Allylierung von ManAcPh **95** nach AAV **1a**.

Ansatz: 550 mg (1.85 mmol) *N*-Phenylacetyl-2-amino-2-desoxy-D-mannopyranose **95**
 715 mg (3.70 mmol) Ethyl-2-(brommethyl)-acrylat
 425 mg (3.70 mmol) Indium
 in 20 ml Ethanol, 5 ml 0.1 M HCl_{aq} und 5 ml Wasser

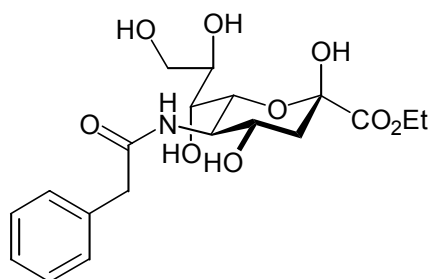
Ausbeute: 480 mg (63%) **96** als farbloser Feststoff nach Chromatographie an Kieselgel
(Chloroform : Methanol = 5:1 → 3:1)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 7.25-7.38 (m, 5H, H-ar), 6.13 (s, 1H, $=\text{CH}_{2a}$), 5.45 (s, 1H, $=\text{CH}_{2b}$), 4.30 (m, 1H, H-4), 4.18 (q, 2H, Et), 3.82 (s, 2H, CH_2 Bn), 3.58-3.92 (m, 6H, H-5,6,7,8,9), 2.30-2.40 (m, 2H, H-3), 1.30 (t, 3H, Et).
 $J_{\text{Et}} = 7.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ = 175.53 (C=O, PhAc), 168.70 (C-1), 138.56 (C-2), 136.92 (C-ar_i), 130.48, 129.89, 128.12 (C-ar), 128.26 ($=\text{CH}_2$), 72.66 (C-4), 71.54 (C-8), 69.67 (C-7), 68.50 (C-6), 65.26 (C-9), 62.10 (Et), 54.89 (C-5), 44.52 (CH_2 Bn), 38.20 (C-3), 14.67 (Et).

$\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{NO}_8$: 411.45

2.3.85. Ethyl-3,5-didesoxy-5-(phenylacetyl-amino)-D-glycero-D-galacto-non-2-ulo-pyranosat (**97**)



Ozonolyse von **96** nach AAV 3.

Ansatz: 410 mg (1.0 mmol) Ethyl-2,3,5-tridesoxy-2-methylen-5-(phenylacetylamino)-*D-glycero-D-galacto*-nononat **96**
in 15 ml Methanol

Ausbeute: 405 mg (98%) **97** als farbloser Feststoff

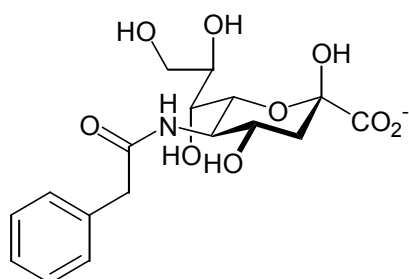
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 7.28-7.35 (m, 5H, H-ar), 4.22 (q, 2H, Et), 4.04-4.18 (m, 2H, H-4,6), 3.84 (s, 2H, CH_2 Bn), 3.40-3.89 (m, 5H, H-5,7,8,9), 2.27 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.84 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.29 (t, 3H, Et).

$J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.9$, $J_{3\text{eq},4} = 4.9$, $J_{3\text{ax},4} = 11.6$, $J_{\text{Et}} = 7.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ = 176.16 (C=O, PhAc), 172.21 (C-1), 136.82 (C-ar_i), 130.40, 129.84, 128.16 (C-ar), 96.81 (C-2), 72.18 (C-8), 71.92 (C-6), 70.24 (C-7), 67.82 (C-4), 65.00 (C-9), 63.66 (Et), 54.25 (C-5), 43.98 (CH_2 Bn), 40.51 (C-3), 14.54 (Et).

$\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{NO}_9$: 413.42

2.3.86. 3,5-Didesoxy-5-(phenylacetylamino)-*D-glycero-D-galacto*-2-nonulosonsäure (**98**)



Hydrolyse von **97** nach AAV 4.

Ansatz: 207 mg (0.50 mmol) Ethyl-3,5-didesoxy-5-(phenylacetyl-amino)-D-*glycero*-D-*galacto*-non-2-ulopyranosid **97**

Ausbeute: 180 mg (94%) **98** als farbloser Feststoff nach Lyophilisation.

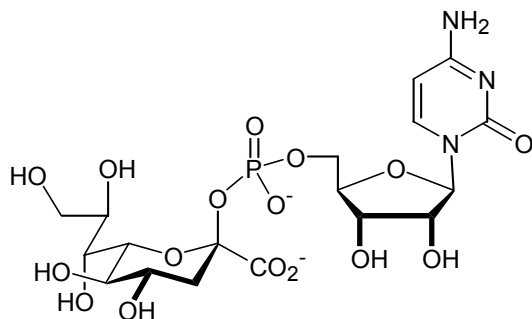
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ = 7.30-7.38 (m, 5H, H-ar), 4.00-4.12 (m, 2H, H-4,6), 3.79 (s, 2H, CH_2 Bn), 3.43-3.89 (m, 5H, H-5,7,8,9), 2.22 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.79 (dd, 1H, H-3_{ax}).

$J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.9$, $J_{3\text{eq},4} = 4.8$, $J_{3\text{ax},4} = 11.8$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ = 179.62 (C-1), 178.16 (C=O, PhAc), 137.95 (C-ar_i), 131.82, 131.50, 130.20 (C-ar), 99.27 (C-2), 73.18 (C-8), 73.02 (C-6), 71.38 (C-7), 69.90 (C-4), 66.16 (C-9), 55.18 (C-5), 45.53 (CH_2 Bn), 42.35 (C-3).

$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_9$: 385.37

2.3.87. Cytidin-5'-monophospho-3-desoxy- β -D-*glycero*-D-*galacto*-2-nonulosonsäure (CMP-KDN, **99**)



CMP-Aktivierung von KDN nach AAV **8**.

Ansatz: 26.8 mg (0.1 mmol) KDN
57.2 mg (0.1 mmol) CTP (2 mol Na/mol, 2.5 H₂O/mol)
2.5 U anorganische Pyrophosphatase
40 U CMP-Sialat-Synthetase
in 1.25 ml Puffer

Ausbeute: 45.0 mg (78%) CMP-KDN **99** als farbloser Feststoff.

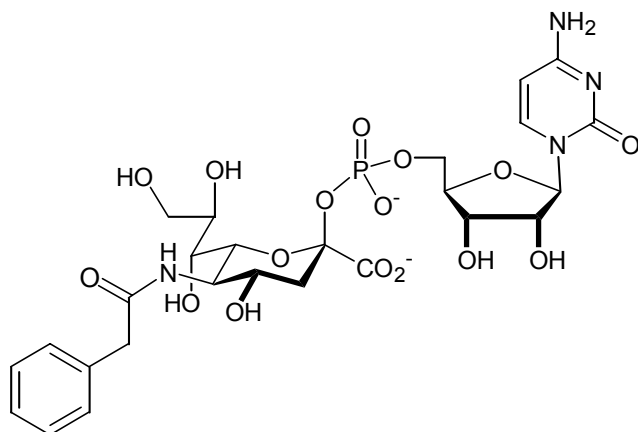
¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 7.97 (d, 1H, H-6''), 6.16 (d, 1H, H-5''), 6.02 (d, 1H, H-1'), 4.24-4.40 (m, 5H, Ribose), 3.60-4.11 (m, 7H, H-4-H-9), 2.45 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.63 (ddd, 1H, H-3_{ax}).

$J_{3eq,3ax} = 13.3$, $J_{3eq,4} = 4.9$, $J_{3ax,4} = 11.8$, $J_{1',2'} = 4.3$, $J_{5'',6''} = 7.5$ Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): δ = 177.47 (C-1), 168.97 (C-4''), 160.59 (C-2''), 144.43, 144.33 (C-5'', C-6''), 99.53 (C-2), 85.56 (C-1'), 77.10, 75.86, 72.71, 72.56, 72.20, 71.75, 71.45, 71.15 (C-4,5,6,7,8,2',3',4'), 67.67 (C-5'), 66.16 (C-9), 43.79 (C-3).

C₁₈H₂₈N₃O₁₆P: 573.40 (freie Säure)

2.3.88. Cytidin-5'-monophospho-3,5-didesoxy-5-(phenylacetyl-amino)- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulosonsäure (CMP-Neu5PhAc, 100)



CMP-Aktivierung von Neu5PhAc nach AAV 8

Ansatz: 38.4 mg (0.1 mmol) Neu5PhAc
57.2 mg (0.1 mmol) CTP (2 mol Na/mol, 2.5 H₂O/mol)
2.5 U anorganische Pyrophosphatase
50 U CMP-Sialat-Synthetase
in 1.25 ml Puffer

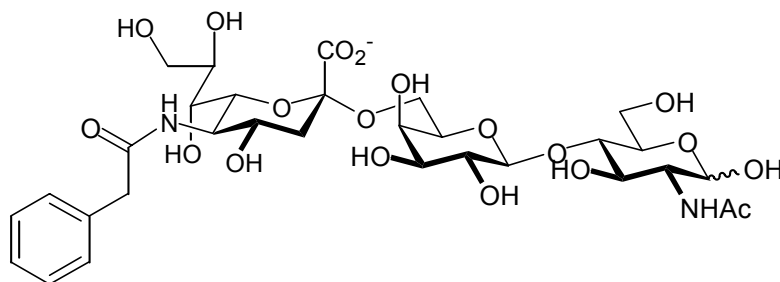
Ausbeute: 48.0 mg (67%) CMP-Neu5PhAc **100** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 7.97 (d, 1H, H-6''), 7.35-7.45 (m, 5H, H-ar), 6.13 (d, 1H, H-5''), 5.99 (d, 1H, H-1'), 4.22-4.40 (m, 5H, Ribose), 3.72 (s, 2H, CH₂ Bn), 3.65-4.13 (m, 5H, H-4,5,6,8,9a), 3.49 (dd, 1H, J = 11.7, 6.8 Hz, H-9b), 3.28 (d, 1H, J = 9.7 Hz, H-7), 2.51 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.65 (ddd, 1H, H-3_{ax}).
 $J_{3eq,3ax} = 13.3$, $J_{3eq,4} = 4.9$, $J_{3ax,4} = 11.8$, $J_{1',2'} = 4.3$, $J_{5'',6''} = 7.6$ Hz.

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): δ = 178.14 (Nac), 177.26 (C-1), 168.97 (C-4''), 160.58 (C-2''), 144.43, 144.33 (C-5'', C-6''), 137.97 (C-ar_i), 131.94, 131.84 (2 C-2_{ar}, 2 C-3_{ar}), 130.20 (C-4_{ar}), 99.49 (C-2), 85.80 (C-1'), 77.10, 74.65, 72.55, 72.19, 71.75, 71.72, 69.50 (C-4,6,7,8,2',3',4'), 67.69 (C-5'), 65.88 (C-9), 54.70 (C-5), 45.57, 45.55 (CH₂ Bn, C-3).

C₂₆H₃₅N₄O₁₆P: 713.16 (freie Säure)

2.3.89. 3,5-Didesoxy-5-(phenylacetylamino)- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulosonsäure-(2,6)- β -D-galactopyranosyl-(1,4)-2-(acetylamino)-2-desoxy-D-glucopyranose (Neu5PhAc- α -2,6-LacNAc, **101)**



Enzymatische Sialylierung von LacNAc mit CMP-Neu5PhAc nach **AAV 9**.

Ansatz: 5 mg (13 μ mol) LacNAc
 15-20 μ mol CMP-Neu5PhAc
 20 mU α -2,6-SiaT
 15 U CIAP
 6 d

Ausbeute: 4.0 mg (41%) **101** als farbloser Feststoff

R_f-Wert: 0.64 (Butanol-Aceton-Wasser : 5-4-1)

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.35-7.45 (m, 5H, H-ar), 5.20 (d, 0.6H, J = 2.4 Hz, H-1 α), 4.75 (d, 0.4H, J = 8.0 Hz, H-1 β), 4.45 (2d, 1H, J = 7.9 Hz, H-1''), 3.75-4.00 (m, 9H), 3.72 (s, 2H, CH₂ Bn), 3.51-3.70 (m, 10H), 2.68 (dd, 1H, H-3''eq), 2.02 (s, 3H, Ac) 1.71 (dd, 1H, H-3''ax).

$J_{3''eq,3''ax} = 12.4$, $J_{3''eq,4} = 4.6$, $J_{3''ax,4} = 12.0$ Hz.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ = 178.33 (NAc β), 177.32 (NAc α), 176.32 (NAc''), 175.83 (C-1''), 137.93 (C-ar_i), 131.92, 131.81 (2 C-2_{ar}, 2 C-3_{ar}), 130.19 (C-4_{ar}), 106.32 (C-1'), 103.07 (C-2'') 97.58 (C-1 β), 93.45 (C-1 α), 83.77 (C-4), 77.44, 76.74,

76.58, 75.39, 75.35, 74.67, 73.66, 72.91, 71.43, 70.88 (C-4''), 66.21 (C-6'), 65.67 (C-9''), 63.66, 63.15 (C-6), 58.95 (C-2 β), 56.30 (C-2 α), 54.86 (C-5''), 45.58 (CH₂ Bn), 43.06 (C-3''), 25.16 (NAc β), 24.86 (NAc α).

C₃₁H₄₅N₂O₁₉: 749.69

VI. Literaturverzeichnis

- [1] R. A. Dwek »Glycobiology: Toward understanding the function of sugars« *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683.
- [2] A. Varki »Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct« *Glycobiology* **1993**, 3, 97.
- [3] J. C. Paulson »Glycoproteins: what are the sugar chains for?« *Trends Biochem. Sci.* **1989**, 3, 272.
- [4] C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto »Enzyme in der organischen Synthese: das Problem der molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (Teil 1)« *Angew. Chem.* **1995**, 107, 453.
- [5] H. Lis, N. Sharon »Kohlenhydrate und Zellerkennung« *Spektrum der Wissenschaft* **1993**, 66.
- [6] T. Feizi, M. Larkin »AIDS and glycosylation« *Glycobiology* **1990**, 1, 17.
- [7] J. Axford »Glycobiology and medicine: an introduction« *J. Roy. Soc. Med.* **1997**, 90, 260.
- [8] V. P. Bhavanandan »Cancer-associated mucins and mucin-type glycoproteins« *Glycobiology* **1991**, 1, 493.
- [9] M. S. Bretscher »Die Moleküle der Zellmembran« in *Die Moleküle des Lebens* (Hrsg.: P. Sitte), Spektrum der Wissenschaft: Heidelberg, **1988**, 86.
- [10] M. J. Berridge »Die Signalübertragung in der Zelle« in *Die Moleküle des Lebens* (Hrsg.: P. Sitte), Spektrum der Wissenschaft: Heidelberg, **1988**, 154.
- [11] A. F. Horwitz »Integrine« *Spektrum der Wissenschaft*, **1998**, 86.
- [12] S.-I. Hakomori, Y. Igarashi »Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling« *J. Biochem.* **1995**, 118, 1091.
- [13] T. Yamakawa »Thus starting ganglioside research« *Trends Biochem. Sci.* **1988**, 13, 452.

- [14] E. G. Bremer, S.-I. Hakomori, D. F. Bowen-Pope, E. Raines, R. Ross »Ganglioside-mediated modulation of cell growth, growth factor binding, and receptor phosphorylation« *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 6818.
- [15] E. G. Bremer, J. Schlessinger, S.-I. Hakomori »Ganglioside-mediated modulation of cell growth: specific effects of G_{M3} tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor« *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 2434.
- [16] N. Hanai, G. A. Nores, C. MacLeod, C.-R. Torres-Mendez, S.-I. Hakomori »Ganglioside-mediated modulation of cell growth: specific effects of G_{M3} and lyso-G_{M3} in tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor« *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 10915.
- [17] F. M. B. Weis, R. J. Davis, »Regulation of epidermal growth factor receptor signal transduction: role of gangliosides« *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 12059.
- [18] K. K.-C. Liu, S. J. Danishefsky »A striking example of the interfacing of glycal chemistry with enzymatically mediated sialylation: a concise synthesis of G_{M3}« *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4933.
- [19] Y. Ito, J. C. Paulson »A novel strategy for the synthesis of ganglioside G_{M3} using an enzymatically produced sialoside glycosyl donor« *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 1603.
- [20] Y. Nagai, M. Iwamori »Cellular biology of gangliosides« in *Biology of the sialic acids* (Hrsg.: A. Rosenberg), Plenum Press: New York, London, **1995**, 197.
- [21] S.-I. Hakomori »Role of gangliosides in transmembrane signaling and cell recognition« in *Biology of the sialic acids* (Hrsg.: A. Rosenberg), Plenum Press: New York, London, **1995**, 243.
- [22] A. Rebbaa, J. Hurh, H. Yamamoto, D. S. Kersey, E. G. Bremer »Ganglioside G_{M3} inhibition of EGF receptor mediated signal transduction« *Glycobiology* **1996**, 6, 399.
- [23] K. K.-C. Liu, S. J. Danishefsky »A paradigm case for the merging of glycal and enzymatic assembly methods in glycoconjugate synthesis: a highly efficient chemoenzymatic synthesis of G_{M3}« *Chem. Eur. J.* **1996**, 2, 1359.
- [24] A. Giannis »Die Sialyl-Lewis-X-Gruppe und ihre Analoga als Liganden für Selektine: chemoenzymatische Synthesen und biologische Funktionen« *Angew. Chem.* **1994**, 106, 188.
- [25] L. A. Lasky »Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation« *Science* **1992**, 258, 964.

- [26] G. J. McGarvey, C.-H. Wong »Chemical, enzymatic and structural studies in molecular glycobiology« *Liebigs Ann.* **1997**, 1059.
- [27] A. Rosenberg »Biology of the sialic acids« Plenum Press: New York, London **1995**.
- [28] G. Reuter, H. J. Gabius »Sialic acids: Structure – analysis – metabolism – occurrence - recognition« *Biol. Chem. Hoppe - Seyler* **1996**, 377, 325.
- [29] R. Schauer, H.-P. Buscher *Biochem. Biophys. Acta* **1974**, 338, 369.
- [30] M. F. Czarniecki, E. R. Thornton »Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spin-Lattice Relaxation in the *N*-Acylneuraminic Acids. Probes for Internal Dynamics and Conformational Analysis« *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 8273.
- [31] R. Roy, C. A. Laferrière »Synthesis of protein conjugates and analogues of *N*-acetylneuraminic acid« *Can. J. Chem.* **1990**, 68, 2045.
- [32] G. Blix *Meth. Carbohydr. Chem.* **1962**, 1, 246.
- [33] A. P. Corfield, R. Schauer »Isolation und purification of sialic acids« in *Sialic acids – Chemistry, metabolism and function* (Hrsg.: R. Schauer), Springer-Verlag: Wien, **1982**, 51.
- [34] M. P. DeNinno »The synthesis and glycosidation of *N*-acetylneuraminic acid« *Synthesis* **1991**, 583.
- [35] K. Okamoto, T. Goto »Glycosidation of sialic acids« *Tetrahedron* **1990**, 46, 5835-5857.
- [36] U. Dabrowski, H. Friebohn, R. Brossmer, M. Supp »¹H-NMR studies at *N*-acetyl-D-neuraminic acid ketosides for the determination of the anomeric configuration II« *Tetrahedron Lett.* **1979**, 48, 4637.
- [37] H. Friebohn, M. Supp, R. Brossmer, G. Keilich, D. Ziegler »¹H-NMR-Untersuchungen zur Mutorotation der *N*-Acetyl-D-neuraminsäure« *Angew. Chem.* **1980**, 92, 200.
- [38] F. Ahmad, P. McPhie *Int. J. Biochem.* **1980**, 11, 91.
- [39] R. W. Jeanloz, J. F. Codrington in *Biological Roles of Sialic Acid* (Hrsg.: A. Rosenberg, C. L. Schengrund), Plenum Press: New York, **1976**, 201.
- [40] R. Schauer »Chemistry, Metabolism, and Biological Functions of Sialic Acids« *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1982**, 40, 13.
- [41] G. Herrler, J. Hausmann, H.-D. Klenk »Sialic Acid as Receptor Determinant of Ortho- and Paramyxoviruses« in *Biology of the sialic acids* (Hrsg.: A. Rosenberg), Plenum Press: New York, London, **1995**, 315.

- [42] R. Schauer *TIBS* **1985**, *10*, 357.
- [43] D. Danon, Y. Marikovsky *C. R. Acad. Sci.* **1961**, 253, 12.
- [44] J. M. Jancik, R. Schauer, H.-J. Streicher »Influence of Membrane-Bound N-Acetylneuraminic Acid on the Survival of Erythrocytes in Man« *Z. Physiol. Chem.* **1975**, 356, 1329.
- [45] W.-D. Fessner, C. Walter »Enzymatic C-C Bond Formation in Asymmetric Synthesis« *Top. Curr. Chem.* **1996**, *184*, 98.
- [46] M.-J. Kim, W. J. Hennen, H. M. Sweers, C.-H. Wong »Enzymes in Carbohydrate Synthesis: N-Acetylneuraminic Acid Aldolase Catalyzed Reactions and Preparation of N-Acetyl-2-deoxy-D-neuraminic Acid Derivatives« *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6481.
- [47] J. L.-C. Liu, G.-J. Shen, Y. Ichikawa, J. F. Rutan, G. Zapata, W. F. Vann, C.-H. Wong »Overproduction of CMP-Sialic Acid Synthetase for Organic Synthesis« *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3901.
- [48] C.-H. Lin, T. Sugai, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, C.-H. Wong »Unusual Stereoselectivity in Sialic Acid Aldolase-Catalyzed Aldol Condensations: Synthesis of Both Enantiomers of High-carbon Monosaccharides« *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10138.
- [49] D. G. Comb, S. Roseman »The sialic acids« *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 2529.
- [50] R. S. Blacklow, L. Warren »The biosynthesis of sialic acid by *Neisseria meningitidis*« *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 3520.
- [51] C. Gonzales-Clemente, J. M. Luengo, L. B. Rodriguez-Aparicio, M. A. Ferrero, A. Reglero »High production of polysialic acid [Neu5Ac α (2-8)-Neu5Ac α (2-9)]_n by *Escherichia coli* K92 grown in a chemically defined medium« *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1990**, 371, 1101.
- [52] M. Knorst »Neue Enzyme zur Synthese von sialinsäurehaltigen Oligosacchariden« *Dissertation*, RWTH Aachen **1999**.
- [53] T. A. Killinger, N. A. Boughton, T. A. Runge, J. Wolinsky »Alcohols as Solvent for the Generation and Reaction of Allylic Zinc Halides with Aldehydes and Ketones« *J. Organomet. Chem.* **1977**, *124*, 131.
- [54] T. H. Chan, C. J. Li, M. C. Lee, Z. Y. Wei »Organometallic-type reactions in aqueous media – a new challenge in organic synthesis« *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 1181.

- [55] C.-J. Li »Organic Reactions in Aqueous Media – With a Focus on Carbon-Carbon Bond Formation« *Chem. Rev.* **1993**, 2023.
- [56] A. Lubineau, J. Augé, Y. Queneau »Water-Promoted Organic Reactions« *Synthesis* **1994**, 741.
- [57] C.-J. Li »Aqueous Barbier-Grignard Type Reaction: Scope, Mechanism, and Synthetic Applications« *Tetrahedron* **1996**, 52, 5643.
- [58] J. Nokami, J. Otera, T. Sudo, R. Okawara »Allylation of Aldehydes and Ketones in the Presence of Water by Allylic Bromides, Metallic Tin and Aluminium« *Organometallics* **1983**, 2, 191.
- [59] C. Petrier, J. L. Luche »Allylzinc Reagent Additions in Aqueous Media« *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 910.
- [60] C. Petrier, J. Einhorn, J. L. Luche »Selective Tin and Zinc Mediated Allylations of Carbonyl Compounds in Aqueous Media« *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 1449.
- [61] S. R. Wilson, M. E. Guazzaroni »Synthesis of Homoallylic Alcohols in Aqueous Media« *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 3087.
- [62] C. Einhorn, J. L. Luche »Selective Allylation of Carbonyl Compounds in Aqueous Media« *J. Organomet. Chem.* **1987**, 177.
- [63] W. Schmid, G. M. Whitesides »Carbon-Carbon Bond Formation in Aqueous Ethanol: Diastereoselective Transformation of Unprotected Carbohydrates to Higher Carbon Sugars Using Allyl Bromide and Tin Metall« *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 6674.
- [64] E. Kim, D. M. Gordon, W. Schmid, G. M. Whitesides »Tin- and Indium-Mediated Allylation in Aqueous Media: Application to Unprotected Carbohydrates« *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5500.
- [65] C. J. Li, T. H. Chan »Organic Syntheses Using Indium-Mediated and Catalyzed Reactions in Aqueous Media« *Tetrahedron* **1999**, 55, 11149.
- [66] C. J. Li, T. H. Chan »Organometallic Reactions in Aqueous Media with Indium« *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 7017.
- [67] C. Walter »Chemische und enzymatische C-C-Verknüpfungen in wässrigem Medium« *Dissertation*, RWTH Aachen **1996**.
- [68] D. M. Gordon, G. M. Whitesides »Indium-Mediated Allylations of Unprotected Carbohydrates in Aqueous Media: A Short Synthesis of Sialic Acids« *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7937.

- [69] T.-H. Chan, M.-C. Lee »Indium-Mediated Coupling of α -(Bromomethyl)acrylic Acid with Carbonyl Compounds in Aqueous Media. Concise Synthesis of (+)-3-Deoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-nonulosonic Acid and N-Acetylneuraminic Acid« *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4228.
- [70] T.-H. Chan, C.-J. Li »A Concise Chemical Synthesis of (+)-3-Deoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-nonulosonic acid (KDN)« *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 747.
- [71] P. Cintas »Synthetic Organoindium Chemistry: What Makes Indium so Appealing?« *Synlett* **1995**, 1087.
- [72] G. M. Watt, P. A. S. Lowden, S. L. Flitsch »Enzyme-catalyzed formation of glycosidic linkages« *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 652-660.
- [73] E. Frankland »Über die Isolierung der organischen Radikale« *Ann.* **1849**, *71*, 171.
- [74] A. Reformatzky »Neue Synthesen zweiatomiger einbasischer Säuren aus den Ketonen« *Ber.* **1887**, *20*, 1210.
- [75] P. Barbier *Compt. Rend.* **1899**, *128*, 110.
- [76] V. Grignard *Compt. Rend.* **1890**, *130*, 1322.
- [77] Y. Yamamoto, N. Asao »Selective Reactions Using Allylic Metals« *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2207.
- [78] Z. N. Parnes, G. I. Bolestova »Reactions Proceeding with the Cleavage of Silicon-Carbon Bonds in Tetraorganosilanes« *Synthesis* **1984**, 997.
- [79] A. Hafner, R. O. Duthaler, R. Marti, G. Rihs, P. Rothe-Streit, F. Schwarzenbach »Enantioselective Allyltitanation of Aldehydes with Cyclopentadienyldialkoxyallyltitanium Complexes« *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2321.
- [80] A. Pelter, K. Smith, H. C. Brown »Borane Reagents« Academic Press: New York **1988**, 310.
- [81] C. Einhorn, J. Einhorn, J. L. Luche »Sonochemistry: The Use of Ultrasonic Waves in Synthetic Organic Chemistry« *Synthesis* **1989**, 787.
- [82] J. D. Sprich, G. S. Lewandos »Sonochemical Removal of Adsorbed Water and Alcohols from Magnesium Surfaces« *Inorg. Chim. Acta.* **1983**, *76*, L-241-242.
- [83] T. J. Mason, J. P. Lorimer »Sonochemistry: theory, applications and uses of ultrasound in chemistry« Ellis Horwood: Chichester **1988**, 74.
- [84] J. Gao, R. Härter, D. A. Gordon, G. M. Whitesides »Synthesis of KDO Using Indium-Mediated Allylation of 2,3:4,5-Di-*O*-isopropylidene-D-arabinose in Aqueous Media« *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3714.

- [85] A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg »Lehrbuch der anorganischen Chemie« Walter de Gruyter: Berlin, New York **1985**, 890.
- [86] S.-K. Choi, S. Lee, G. M. Whitesides »Synthesis of C-5 Analogs of *N*-Acetylneuraminic Acid via Indium-Mediated Allylation of *N*-Substituted 2-Amino-2-deoxymannoses« *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8739.
- [87] G. Jander, E. Blasius »Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie« Hirzel: Stuttgart **1989**, 295.
- [88] L. Gmelin »Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie« Verlag Chemie: Berlin **1936**, System-Nr. 37.
- [89] M. Warwel, W.-D. Fessner »Indium-Mediated Chain-Extension: An Improved Protocol for the Concise, Diastereospecific Synthesis of KDN and Other Sialic Acids« *Synlett* **2000**, *6*, 865.
- [90] J. Mulzer »Die Cram'sche Regel« *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1984**, *32*, 16.
- [91] M. T. Reetz »Chelat- oder Nicht-Chelat-Kontrolle bei Additionsreaktionen von chiralen α - und β -Alkoxycarbonylverbindungen« *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 542.
- [92] J. M. Fleischer, A. J. Gushurst, W. L. Jorgensen »Computer assisted mechanistic evaluations of organic reactions. 26. Diastereoselective addition: Cram's rule« *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 490.
- [93] L. A. Paquette »Green Chemistry, frontiers in benign Chemical Syntheses and Processes« Eds.: P. Anastas, T. C. Williamson, Oxford University Press: New York **1998**.
- [94] L. A. Paquette, T. M. Mitzel »Chelation Control Associated with Organometallic Addition Reactions in Water. The High Stereoselectivity offered by α - and β -Hydroxyl Substituents obviates the Need for Protecting Groups« *Tetrahedron Lett.* **1995**, *38*, 6863.
- [95] L. A. Paquette, T. M. Mitzel »Addition of Allylindium Reagents to Aldehydes Substituted at C_α or C_β with Heteroatomic Functional Groups. Analysis of the Modulation in Diastereoselectivity Attainable in Aqueous, Organic, and Mixed Solvent Systems« *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1931.
- [96] R. J. Maguire, J. Mulzer, J. W. Bats »1,4-Asymmetric Induction in the Chromium(II)- and Indium-Mediated Coupling of Allyl Bromides to Aldehydes« *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6936.

- [97] L. A. Paquette, M. Stepanian, U. V. Mallavadhani, T. D. Cutarelli, T. B. Lowinger, H. J. Klemeyer »Definition of Several Control Elements Relevant to the Stereodefined Serial Elaboration of Belted Poly(spirotetrahydrofurans) Fitted with a Cyclohexane Core« *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7492.
- [98] L. A. Paquette, T. M. Mitzel »Comparative Diastereoselectivity Analysis of Crotylindium and 3-Bromoallylindium Additions to α -Oxy Aldehydes in Aqueous and Nonaqueous Solvent Systems« *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8799.
- [99] L. A. Paquette, G. D. Bennett, A. Chhatrwalla, M. B. Isaac »Factors Influencing 1,4-Asymmetric Induction during Indium-Promoted Coupling of Oxygen-Substituted Allylic Bromides to Aldehydes in Aqueous Solution« *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3370.
- [100] L. A. Paquette, T. M. Mitzel, M. B. Isaac, C. F. Crasto, W. W. Schomer »Diastereoselection during 1,2-Addition of the Allylindium Reagent to α -Thia and α -Amino Aldehydes in Aqueous and Organic Solvents« *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4293.
- [101] M. B. Isaac, L. A. Paquette »Experimental Test of Setting Three Contiguous Stereogenic Centers in Water. Diastereoselective Coupling of Geometrically Biased Allylic Bromides to α -Oxy Aldehydes with Indium« *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5333.
- [102] L. A. Paquette, R. R. Rothhaar, M. Isaac, L. M. Rogers, R. D. Rogers »Diastereo- and Enantiodifferentiation in Indium-Promoted Allylations of 2,3-Azetidinediones in Water. Definition of Long-Range Stereocontrol Elements on π -Facial Selectivity for β -Lactam Synthesis« *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5463.
- [103] L. A. Paquette, R. R. Rothhaar »Competitive Intramolecular/Intermolecular Chelation Options Operative during Indium-Promoted Additions to Pyridyl Aldehydes and to Glyoxylic Acid under Aqueous Conditions« *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 217.
- [104] W. H. Binder, R. H. Prenner, W. Schmid »Indium-Mediated Allylation of Aldehydes: A Convenient Route to 2-Deoxy and 2,6-Dideoxy Carbohydrates« *Tetrahedron* **1994**, *50*, 749.
- [105] J. Villieras, M. Rambaud »Wittig-Horner Reaction in Heterogeneous Media; 1. An Easy Synthesis of Ethyl α -Hydroxymethylacrylate and Ethyl α -Halomethylacrylates Using Formaldehyde in Water« *Synthesis* **1982**, 924.
- [106] J. Villieras, M. Rambaud »Ethyl α -(Hydroxymethyl)acrylate (2-Propenoic acid, 2-(hydroxymethyl)-ethyl ester)« *Org. Synth.* **1987**, *66*, 220.
- [107] M. Warwel »Synthese von Neuraminsäure-Analoga zur Bestimmung der Substrattoleranz der CMP-Neu5Ac-Synthetase« *Diplomarbeit*, RWTH Aachen **1997**.

- [108] J. Jurczak, A. Golebiowski »Optically Active N-Protected α -Amino Aldehydes in Organic Synthesis« *Chem. Rev.* **1989**, 89, 149.
- [109] A. Ito, R. Takahashi, Y. Baba »A New Method to synthesize α -Aminoaldehydes« *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, 23, 3081.
- [110] M. Narita, S. Otsuka, S. Kobayashi, M. Ohno, Y. Umezawa, H. Morishima, S. Saito, T. Takita, H. Umezawa »Stereoselective Synthesis of (2S, 3S, 4R)-4-Amino-3-hydroxyl-2-Methyl-Pentanoic Acid, an Amino Acid Constituent of Bleomycin, by Aldol Condensation« *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 525.
- [111] S. Danishefsky, S. Kobayashi, J.-F. Kerwin »Cram Rule Selectivity in the Lewis Acid Catalyzed Cyclocondensation of Chiral Aldehydes. A Convenient Route to Chiral Systems of Biological Interest« *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 1981.
- [112] M. J. Hensel, P. L. Fuchs *Synth. Commun.* **1986**, 16, 1285.
- [113] J. G. Hanson, T. Lindberg »Synthesis of New Dipeptide Analogues Containing Novel Ketovinyl and Hydroxyethylidene Isosters via Grignard Addition to Chiral α -Amino Aldehydes« *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 5399.
- [114] Y. Ohfuné, N. Kurokawa »Synthesis of the Serine Equivalent, (2R) and (2S)-Amino-3-Butenol Derivatives. Synthetic Approaches to the Metal Chelating Poly-Amino Acid, "Aspergillomarasmine A"« *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1071.
- [115] C. H. Hassall, J. O. Thomas »Amino-acids and Peptides. Part VII. The Synthesis of the Fourteen-membered Cyclodepsipeptides D-D, L-L, and D-L-Cyclodi-(β -seryloxypropionyl)« *J. Chem. Soc.* **1968**, 1495.
- [116] D. B. Dess, J. C. Martin »A Useful 12-I-5 Triacetoxyperiodinane (the Dess-Martin-Periodinane) for the Selective Oxidation of Primary or Secondary Alcohols and a Variety of Related 12-I-5 Species« *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7277.
- [117] S. Steurer, J. Podlech »Aminoalkyl-Substituted α -Methylene- γ -butyrolactones from α -Amino Acids Using an Indium-Mediated Barbier Allyl Addition« *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1551.
- [118] R. R. Hung, J. A. Straub, G. M. Whitesides » α -Amino Aldehyde Equivalents as Substrates for Rabbit Muscle Aldolase: Synthesis of 1,4-Dideoxy-D-arabinitol and 2(R),5(R)-Bis(hydroxymethyl)-3(R),4(R)-dihydroxypyrrolidine« *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 3849.

- [119] M. Arimoto, H. Yamaguchi, E. Fujita »Iodosylbenzene-Trimethylsilyl Azide-Boron Trifluoride Etherate: A Highly Efficient System for Direct Synthesis of Allyl Azides from Allylsilanes« *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 6289.
- [120] S. I. Murahashi, Y. Taniguchi, Y. Imada *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 3289.
- [121] M. D. Chappell, R. L. Halcomb »Synthesis of a Six-Carbon Sialic Acid Using an Indium-Mediated Coupling« *Org. Lett.* **2000**, Vol. 2, 14, 2003.
- [122] O. Eyrisch »Chemoenzymatische Synthesen seltener und neuer Kohlenhydrate mit diversen Aldolasen, Isomerasen und Oxidoreduktasen« *Dissertation*, Universität Freiburg **1994**.
- [123] D. Holland, J. F. Stoddart »Regioselective and Stereoselective Methods for the Synthesis of the Pentitols« *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1983**, 1553.
- [124] V. Jäger, W. Hümmer, U. Stahl, T. Gracza »Controlled Synthesis of Enantio-, Regio-, and Diastereomers of Amino-4-pentenediols from 1,4 Pentadien-3-ol via Epoxy-4-pentenols I.« *Synthesis* **1991**, 769.
- [125] A. S. Serianni, J. Pierce, S.-G. Huang, R. Barker »Anomerization of Furanose Sugars: Kinetics of Ring-Opening Reactions by ^1H and ^{13}C Saturation-Transfer NMR Spectroscopy« *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 4037.
- [126] A. S. Serianni, E. L. Clark, R. Barker »Carbon-13-Enriched Carbohydrates. Preparation of Erythrose, Threose, Glyceraldehyde, and Glycolaldehyde with ^{13}C -Enrichment in Various Carbon Atoms« *Carbohydr. Res.* **1979**, 72, 79.
- [127] L. A. Carpino, G. Y. Han »The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group« *J. Org. Chem.* **1972**, 22, 3404.
- [128] E. L. Allred, J. Sonnenberg, S. Winstein »Preparation of Homobenzyl and Homoallyl Alcohols by the Hydroboration Method« *J. Org. Chem.* **1960**, 25, 28.
- [129] S. Winstein »Homoallyl and Homobenzyl Alcohols By The Hydroboration Method« *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 5833.
- [130] N. Bischofberger, H. Waldmann, T. Saito, E. S. Simon, W. Lees, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides »Synthesis of Analogues of 1,3-Dihydroxyacetone Phosphate and Glyceraldehyde 3-Phosphate for Use in Studies of Fructose-1,6-diphosphate Aldolase« *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 3457.
- [131] B. Carboni, M. Vaultier, R. Carrie »Etude de la Chimioselectivite de la Reaction des Dichloroboranes avec les Azides Fonctionnels: Une Synthese Efficace D'Amines Secondaires Fonctionnalisées« *Tetrahedron* **1987**, 8, 1799.

- [132] U. Kragl, D. Gyga, O. Ghisalba, C. Wandrey »Enzymatische zweistufige Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure im Enzym-Membranreaktor« *Angew. Chem.* **1991**, 103, 854.
- [133] M.-J. Kim, W. J. Hennen, H. M. Sweers, C.-H. Wong »Enzymes in carbohydrate synthesis: *N*-acetylneuraminic acid aldolase catalyzed reactions and preparation of *N*-acetyl-2-deoxy-D-neuraminic acid derivatives« *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6481.
- [134] C. Augé, S. David, C. Gautheron, A. Malleron, B. Cavayé »Preparation of six naturally occurring sialic acids with immobilized acylneuraminate pyruvate lyase« *New. J. Chem.* **1988**, 12, 733.
- [135] C. Augé, C. Gautheron, S. David, A. Malleron, B. Cavayé, B. Bouxom »Sialyl aldolase in organic synthesis: from the trout egg acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonic acid (KDN), to branched-chain higher ketoses as possible new chirons« *Tetrahedron* **1990**, 46, 201.
- [136] R. Brossmer, U. Rose »Enzymatic synthesis of 5-acetamido-9-azido-3,5,9-trideoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid, a 9-azido-9-deoxy derivative of *N*-acetylneuraminic acid« *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 96, 1282.
- [137] W. F. Vann, J. J. Tavarez, J. Crowley, E. Vimr, R. P. Silver »Purification and characterization of the *Escherichia coli* K1 neuB gene product *N*-acetylneuraminic acid synthetase« *Glycobiology* **1997**, 7, 697.
- [138] E. Komaki, Y. Ohta, Y. Tsukada »Purification and characterization of *N*-acetylneuraminate synthase from *Escherichia coli* K1-M12« *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, 61, 2046.
- [139] S. Blechert »Synthese im Blickpunkt: Synthese neuer β -Lactam-Antibiotica« *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1979**, 27, 127.
- [140] W. Dürckheimer, J. Blumbach, R. Lattrell, K. H. Scheunemann »Neuere Entwicklung auf dem Gebiet der β -Lactam-Antibiotica« *Angew. Chem.* **1985**, 97, 183.
- [141] H. Waldmann »The Use of Penicillin Acylase for Selective N-Terminal Deprotection in Peptide Synthesis« *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 1131.
- [142] T. A. Savidge, M. Cole *Methods Enzymol.* **1976**, 43, 705.
- [143] C. Fuganti, P. Grasselli, P. Casati »Immobilized Penicillinacylase: Application to the Synthesis of the Dipeptide Aspartame« *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 3191.
- [144] H. J. Schütz, C. Wandrey, W. Leuchtenberger »Abstracts of the Ninth Engineering Conference on Enzyme Engineering« New York **1987**, I-11.

- [145] C. Fuganti, P. Grasselli, P. F. Seneci, S. Servi, P. Casati »Immobilized Benzylpenicillin Acylase: Application to the Synthesis of Optically Active Forms of Carnitin and Propranolol« *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 2061.
- [146] L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi »Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis« *Science* **1997**, 276, 1125.
- [147] L. K. Mahal, C. R. Bertozzi »Engineered cell surfaces: Fertile ground for molecular landscaping« *Chem. Biol.* **1997**, 4, 415.
- [148] M. Herrmann, C. W. Vonderlieth, P. Stehling, W. Reutter, M. Pawlita »Consequences of a subtle sialic acid modification on the murine polyomavirus receptor« *J. Virol.* **1997**, 71, 5922.
- [149] R. F. Service »Making cells selectively sticky« *Science* **1996**, 273, 1493.
- [150] J. R. Wieser, A. Heisner, P. Stehling, F. Oesch, W. Reutter »In vivo modulated N-acyl side chain of N-acetylneuraminic acid modulates the cell contact-dependent inhibition of growth« *FEBS Lett.* **1996**, 395, 170.
- [151] U. Schumacher, D. Mukhtar, P. Stehling, W. Reutter »Is the lectin binding pattern of human breast and colon cancer cells influenced by modulators of sialic acid metabolism?« *Histochem. Cell Biol.* **1996**, 106, 599.
- [152] O. T. Keppler, P. Stehling, M. Herrmann, H. Kayser, D. Grunow, W. Reutter, M. Pawlita »Biosynthetic modulation of sialic acid-dependent virus-receptor interactions of two primate polyoma viruses« *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 1308.
- [153] H. Kayser, R. Zeitler, C. Kannicht, D. Grunow, R. Nuck, W. Reutter »Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using N-propanoyl-D-hexosamines as precursors« *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 16934.
- [154] A. Lubineau, V. Sommé, C. Augé »Sialyltransferase-catalyzed transfer of KDN onto oligosaccharides« *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **1998**, 5, 235.
- [155] M. von Itzstein, R. J. Thomson »The synthesis of novel sialic acids as biological probes« *Top. Curr. Chem.* **1997**, 186, 119.
- [156] C. C. Lin, C. H. Lin, C. H. Wong »Sialic acid aldolase-catalyzed condensation of pyruvate and N-substituted mannosamine: A useful method for the synthesis of N-substituted sialic acids« *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 2649.
- [157] W. Y. Wu, B. Jin, D. C. M. Kong, M. von Itzstein »A facile synthesis of a useful 5-N-substituted-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid from 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose« *Carbohydr. Res.* **1997**, 300, 171.

- [158] M. Mahmoudian, D. Noble, C. S. Drake, R. F. Middleton, D. S. Montgomery, J. E. Piercey, D. Ramlakhan, M. Todd, M. J. Dawson, »An efficient process for production of *N*-acetylneuraminic acid using *N*-acetylneuraminic acid aldolase« *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, 20, 393.
- [159] M. A. Sparks, K. W. Williams, C. Lukacs, A. Schrell, G. Priebe, A. Spaltenstein, G. M. Whitesides »Synthesis of potential inhibitors of hemagglutination by influenza virus: chemoenzymatic preparation of N-5 analogs of *N*-acetylneuraminic acid« *Tetrahedron* **1993**, 49, 1.
- [160] W. Fitz, C.-H. Wong »Combined use of subtilisin and *N*-acetylneuraminic acid aldolase for the synthesis of a fluorescent sialic acid« *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 8279.
- [161] D. C. M. Kong, M. von Itzstein »The first synthesis of a C-7 nitrogen containing sialic acid analogue, 5-acetamido-7-azido-3,5,7-trideoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonic acid (7-azido-7-deoxy-Neu5Ac)« *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 957.
- [162] Y. Ichikawa, G. C. Look, C.-H. Wong »Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis« *Anal. Biochem.* **1992**, 202, 215.
- [163] S. X. Borsig, G. F. Herrmann, U. Kragl, C. Wandrey, E. G. Berger »Scaled-up expression of human α 2,6(*N*)sialyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*« *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 210, 14.
- [164] M. Gilbert, D. C. Watson, A. M. Cunningham, M. P. Jennings, N. M. Young, W. W. Wakarchuk »Cloning of the lipooligosaccharide α -2,3-sialyltransferase from the bacterial pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*« *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 28271.
- [165] Y. Kajihara, T. Yamamoto, H. Nagae, M. Nakashizuka, T. Sakakibara, I. Terada »A novel α -2,6-sialyltransferase: Transfer of sialic acid to fucosyl and sialyl trisaccharides« *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 8632.
- [166] Y. Yoshida, n. Kurosawa, T. Kanematsu, A. Taguchi, M. Arita, N. Kojima, S. Tsuji »Unique genomic structure and expression of the mouse α 2,8-sialyltransferase (ST8Sia III) gene« *Glycobiology* **1996**, 6, 573.
- [167] A. Lubineau, K. Basset-Carpentier, C. Augé »Porcine liver (2-3)- α -sialyltransferase: Substrate specificity studies and application of the immobilized enzyme to the synthesis of various sialylated oligosaccharide sequences« *Carbohydr. Res.* **1997**, 300, 161.

- [168] M. Gilbert, A. M. Cunningham, D. C. Watson, A. Martin, J. C. Richards, W. W. Wakarchuk »Characterization of a recombinant *Neisseria meningitidis* alpha-2,3-sialyltransferase and its acceptor specificity« *Eur. J. Biochem.* **1997**, 249, 187.
- [169] U. K. Unverzagt, J. C. Paulson »High-efficiency synthesis of sialyloligosaccharides and sialoglycopeptides« *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9308.
- [170] H. J. Gross, U. Rose, J. M. Krause, J. C. Paulson, K. Schmid, R. E. Feeney, R. Brossmer »Transfer of synthetic sialic acid analogues to *N*- and *O*-linked glycoprotein glycans using four different mammalian sialyltransferases« *Biochem.* **1989**, 28, 7386.
- [171] J. A. L. M. Vandorst, J. M. Tikkanen, C. H. Krezdorn, M. B. Streiff, E. G. Berger, J. A. Vankuik, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart »Exploring the substrate specificities of alpha-2,6- and alpha-2,3-sialyltransferases using synthetic acceptor analogues« *Eur. J. Biochem.* **1996**, 242, 674.
- [172] S. Basu, M. Basu, S. S. Basu »Biological specificity of sialyltransferases« in *Biology of the sialic acids* (Hrsg.: A. Rosenberg), Plenum Press: New York **1995**, 69.
- [173] T. M. Martin, R. R. Schmidt »Convenient Chemical Synthesis of CMP-*N*-Acetylneuraminate (CMP-Neu-5-Ac)« *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1765.
- [174] S. Makino, Y. Ueno, M. Ishikawa, Y. Hayakawa, T. Hata »Chemical Synthesis of Cytidine-5'-monophosphono-*N*-acetylneuraminic Acid (CMP-Neu5Ac)« *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 2775.
- [175] M. D. Chappell, R. L. Halcomb »Synthesis of CMP-sialic acid conjugates: Substrates for the enzymatic synthesis of natural and designed sialyl oligosaccharides« *Tetrahedron* **1997**, 53, 11109.
- [176] M. D. Chappell, R. L. Halcomb »Enzyme-catalyzed synthesis of oligosaccharides that contain functionalized sialic acid« *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3393.
- [177] L. Elling »Glycobiotechnology: enzymes for the synthesis of nucleotide sugars« *Adv. Biochem. Eng. / Biotech.* **1997**, 58, 89.
- [178] H. H. Higa, J. C. Paulson »Sialylation of glycoprotein oligosaccharides with *N*-acetyl-, *N*-glycolyl-, *N*-*O*-diacetylneuraminic acids« *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 8838.
- [179] J. Thiem, P. Stangier »Preparative-enzymatic formation of cytidine 5'-monophosphosialate by integrated cytidine 5'-triphosphate regeneration« *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 1101.

- [180] J. Haverkamp, J. M. Beau, R. Schauer »Improved synthesis of CMP-sialates using enzymes from frog liver and equine submandibular gland« *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **1979**, 360, 159.
- [181] T. Terada, S. Kitazume, K. Kitajima, S. Inoue, F. Ito, F. A. Troy, Y. Inoue »Synthesis of CMP-deaminoneuraminic acid (CMP-KDN) using the CTP: CMP-3-deoxynonulosonate cytidylyltransferase from rainbow trout testis« *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 2640.
- [182] L. Warren, R. S. Blacklow »The Biosynthesis of cytidine 5'-monophospho-*N*-acetylneuraminic acid by an enzyme from *Neisseria meningitidis*« *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 3527.
- [183] S. Ganguli, G. Zapata, T. Wallis, C. Reid, G. Boulnois, W. F. Vann, I. S. Roberts »Molecular cloning and analysis of genes for sialic acid synthesis in *Neisseria meningitidis* group B and purification of the meningococcal CMP-NeuNAc synthetase enzyme« *J. Bacteriol.* **1994**, 176, 4583.
- [184] M. Gilbert, D. C. Watson, W. W. Wakarchuk »Purification and characterization of the recombinant CMP-sialic acid synthetase from *Neisseria meningitidis*« *Biotechnol. Lett.* **1997**, 19, 417.
- [185] M. Gilbert, R. Bayer, A. M. Cunningham, S. Defrees, Y. H. Gao, D. C. Watson, N. M. Young, W. W. Wakarchuk »The synthesis of sialylated oligosaccharides using a CMP-Neu5Ac synthetase/sialyltransferase fusion« *Nature Biotechnol.* **1998**, 16, 769.
- [186] M. V. Tullius, R. S. Munson, J. Wang, B. W. Gibson »Purification, cloning, and expression of a cytidine 5'-monophosphate *N*-acetylneuraminic acid synthetase from *Haemophilus ducreyi*« *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 15373.
- [187] R. F. Haft, M. R. Wessels »Characterization of CMP-*N*-acetylneuraminic acid synthetase of group B streptococci« *J. Bacteriol.* **1994**, 176, 7372.
- [188] R. F. Haft, M. R. Wessels, M. F. Mebane, N. Conaty, C. E. Rubens »Characterization of cpsF and its product CMP-*N*-acetylneuraminic acid synthetase, a group B streptococcal enzyme that can function in K1 capsular polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli*« *Mol. Microbiol.* **1996**, 19, 555.
- [189] M. Kittelmann, T. Klein, U. Kragl, C. Wandrey, O. Ghisalba »CMP-*N*-acetylneuraminic acid synthetase from *Escherichia coli*: fermentative production and application for the preparative synthesis of CMP-neuraminic acid« *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, 44, 59.

- [190] S. L. Shames, E. S. Simon, C. W. Christopher, W. Schmid, G. M. Whitesides, L. L. Yang »CMP-*N*-acetylneuraminic acid synthetase of *Escherichia coli*: high level expression, purification and use in the enzymatic synthesis of CMP-*N*-acetylneuraminic acid and CMP-neuraminic acid derivatives« *Glycobiology* **1991**, *1*, 187.
- [191] G.-J. Shen, J. L.-C. Liu, C.-H. Wong »Cloning and overexpression of a tagged CMP-*N*-acetylneuraminic acid synthetase from *E. coli* using a lambda system and application of the enzyme to the synthesis of CMP-*N*-acetylneuraminic acid« *Biocatalysis* **1992**, *6*, 31.
- [192] L. Warren »The thiobarbituric acid assay of sialic acids« *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 1971.
- [193] E. L. Romero, M. F. Pardo, S. Porro, S. Alonso »Sialic acid measurement by a modified Aminoff method: a time saving reduction in 2-thiobarbituric acid concentration« *J. Biochem. Biophys. Meth.* **1997**, *35*, 129.
- [194] P. A. Lanzetta, L. J. Alvarez, P. S. Reinach, O. A. Candia »An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate« *Anal. Biochem.* **1979**, *100*, 95.
- [195] R. K. Scopes »Analysis – measurement of protein and enzyme activity« in *Protein purification: principles and practice* (Hrsg.: R. K. Scopes), Springer-Verlag: New York, Berlin, Heidelberg **1994**, 44.
- [196] R. F. Itzhaki, D. M. Gill »A micro-biuret method for estimating protein« *Anal. Biochem.* **1964**, *9*, 401.
- [197] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall »Protein measurement with the Folin phenol reagent« *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265.
- [198] M. M. Bradford »A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding« *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
- [199] C. Goße »Mechanistische Studien zu metallabhängigen Aldolasen und Isomerasen« *Dissertation*, RWTH Aachen **1997**.
- [200] G. Sinerius »Asymmetrische Aldoladdition durch Enzymkatalyse« *Dissertation*, Universität Freiburg **1994**.
- [201] K. Muttzall »Einführung in die Fermentationstechnik« Behr's Verlag: Hamburg **1993**.
- [202] »Ion exchange chromatography – Principles and methods« *Produktinformation Pharmacia Biotech* **1994**.

- [203] R. K. Scopes »Protein purification: principles and practice« Springer-Verlag: New York, Berlin, Heidelberg **1994**.
- [204] S. C. Mosimann, M. Gilbert, D. Dombrowski, R. To, W. Wakarchuk, N. C. J. Strynadka »Structure of a Sialic Acid-activating Synthetase, CMP-acylneuraminate Synthetase in the Presence and Absence of CDP« *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 8190.
- [205] E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides »Synthesis of CMP-NeuAc from *N*-acetylglucosamin: generation of CTP from CMP using adenylate kinase« *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 7159.
- [206] E. S. Simon, E. J. Toone, G. Ostroff, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides »Preparation of cytidine 5'-monophospho-*N*-acetylneuraminic acid and uridine 5'-diphosphoglucuronic acid; syntheses of α -2,6-sialyllactosamine, α -2,6-sialyllactose, and hyaluronic acid« *Methods Enzymol.* **1989**, 179, 275.
- [207] C. H. Lin, B. W. Murray, I. R. Ollmann, C. H. Wong »Why is CMP-ketodeoxyoctonate highly unstable?« *Biochemistry* **1997**, 36, 780.
- [208] B. A. Horenstein, M. Bruner »Acid-catalyzed solvolysis of CMP-*N*-acetylneuraminate: Evidence for a sialyl cation with a finite lifetime« *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10371.
- [209] B. A. Horenstein, M. Bruner »The *N*-acetyl neuraminyloxocarbenium ion is an intermediate in the presence of anionic nucleophiles« *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1357.
- [210] J. M. Beau, R. Schauer, J. Haverkamp, J. P. Kamerling, L. Dorland, J. F. Vliegthart »Chemical behaviour of cytidine 5'-monophospho-*N*-acetyl-beta-D-neuraminic acid under neutral and alkaline conditions« *Eur. J. Biochem.* **1984**, 140, 203.
- [211] Y. Ichikawa, G.-J. Shen, C.-H. Wong »Enzyme-catalyzed synthesis of sialyl oligosaccharide with *in situ* regeneration of CMP-sialic acid« *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4698.
- [212] Y. Ichikawa, J. L.-C. Liu, G.-J. Shen, C.-H. Wong »A highly efficient multienzyme system for the one-step synthesis of a sialyl trisaccharide: *in situ* generation of sialic acid and *N*-acetylglucosamine coupled with the regeneration of UDP-glucose, UDP-galactose, and CMP-sialic acid« *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 6300.
- [213] C.-H. Wong, Y. Ichikawa, G.-J. Shen, *U.S. Patent 5 278 299*, **1994**.
- [214] H.-J. Gross, A. Bünsch, J. C. Paulson, R. Brossmer »Activation and transfer of novel synthetic 9-substituted sialic acids« *Eur. J. Biochemistry*. **1987**, 168, 595.

- [215] J. Weinstein, U. Souza-e-Silva, J. C. Paulson »Sialylation of glycoprotein oligosaccharides *N*-linked to asparagine« *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 13845.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Mathias Frederik Warwel
Geburtsdatum: 9. März 1971
Geburtsort: Aachen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung

1977 – 1981 evang. Grundschule Annastraße in Aachen
1981 – 1990 Gymnasium Viktoriaschule in Aachen
05 / 1990 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10 / 1990 – 03 / 1993 Chemie-Grundstudium an der RWTH Aachen
03 / 1993 Diplon-Vorprüfung Chemie
04 / 1993 – 10 / 1996 Chemie-Hauptstudium an der RWTH Aachen
10 / 1996 mündliche Diplomprüfung Chemie
12 / 1996 – 06 / 1997 Diplomarbeit
„Synthesen von Neuraminsäure-Analoga zur Bestimmung der Substrattoleranz der CMP-Neu5Ac-Synthetase“
Institut für Organische Chemie, RWTH Aachen
07 / 1997 – 05 / 2001 Dissertation im Arbeitskreis von Prof. W.-D. Fessner
„Untersuchungen zur chemo-enzymatischen Synthese von Sialokonjugaten“
07/1997–08/1998: RWTH Aachen
08/1998–05/2001: TU Darmstadt

Darmstadt, 18. Juli 2001